

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Karolína Moutelíková**

**Vliv chronického působení morfinu na přežití buněk po působení oxidativního stresu  
u neuroblastomové linie SH-SY5Y buněk**

**Effect of chronic morphine on cell survival after oxidative stress in the SH-SY5Y  
neuroblastoma cell line**

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Lucie Hejnová, Ph.D.

Praha, 2018

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 8. 2018

Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce RNDr. Lucii Hejnové, Ph.D. za její maximální pomoc, čas a vstřícný přístup, který mi věnovala po celou dobu vypracování této práce. Dále děkuji celému kolektivu laboratoře za vytvoření příjemného prostředí a jmenovitě Mgr. Zuzaně Čočkové za pomoc s kultivací buněk.

## Abstrakt

Morfin je přirozený alkaloid s velmi potentními analgetickými a sedativními účinky, díky kterým je využíván ve zdravotnictví. V popředí vědeckého zájmu je dlouhou dobu zejména díky schopnosti vyvolat závislost. V posledních letech byla popsána jeho role i v oxidativním stresu. Mnohé studie poukazují na jeho protektivní potenciál, ale na druhou stranu existují i studie, které naopak popisují jeho pro-oxidativní účinky. Jedním z cílů této práce bylo, stanovit vliv chronického působení morfinu na viabilitu diferencovaných buněk neuroblastomové linie SH-SY5Y po vyvolání oxidativního stresu analogem  $H_2O_2$  – tert-buthydroperoxidem (tBHP). Výsledky prokázaly, že morfin má protektivní efekt proti oxidativnímu stresu, přičemž nejvyššího protektivního účinku morfinu je dosaženo v koncentraci 10  $\mu M$ . Morfin na molekulární úrovni působí na signální dráhy mí-opioidních receptorů (MOR) i Toll-like 4 (TLR4). Dalším z cílů bylo určit roli MOR a TLR4 v protektivním působení morfinu proti oxidativnímu stresu u SH-SY5Y buněk pomocí dvou testů. Za prvé to byly testy oxidativního stresu na viabilitu buněk, které ukázaly na majoritní roli TLR4 a minoritní MOR. Za druhé byly sledovány změny v expresi MOR a TLR4 po chronickém působení morfinu pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Výsledky těchto testů neprokázaly signifikantní změny v expresi MOR ani TLR4 vlivem morfinu. Změny v expresi nebyly detekovány ani při zablokování MOR a TLR4 příslušnými antagonisty. Posledním cílem bylo sledovat změny v expresi členů signální kaskády mitogenem aktivovaných proteinkináz (MAPK), které jsou úzce spjaty se signalizací jak MOR, tak TLR4. Nebyly detekovány žádné signifikantní rozdíly v množství vybraných členů této kaskády po chronickém působení morfinu.

Výsledky naší práce prokázaly, že morfin má protektivní účinky proti oxidativnímu stresu. Na tomto efektu se podílí z převážné části TLR4. Chronické působení morfinu patrně neovlivňuje expresi jednotlivých receptorů, stejně tak členů MAPK signální kaskády.

**Klíčová slova:** morfin, protekce, oxidativní stres, tBHP, MOR, TLR4, MAPK

## Abstract

Morphine is a natural opioid which is used in medicine due to his potent analgesic and sedative effects. In the forefront of scientific interest is a chronic usage of opioids which can lead to a development of drug addiction. Morphine role in oxidative stress was described in last years. It was revealed its protective potencial by many studies. However, some studies described its pro-oxidative effect.

The aim of this study was to determinate effect of chronic morphine on cell survival after oxidative stress caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> analog – tBHP in the SH-SY5Y neuroblastoma cell line. The results verified morphine protective effect against oxidative stress. The highest protective effect of morphine was achieved in a concetration of 10 µM. It was described that morphine can induce activation of mu-opioid (MOR) and Toll-like 4 (TLR4) receptors signalling pathway on molecular level. The aim of this thesis was to evaluate the role of MOR a TLR4 in protective effect of morphine against oxidative stress by two methods.

Firstly, it was used tests of oxidative stress on cell viability. The obtained results demonstrated majority role of TLR4 and minory role of MOR. Afterwards, we assesed changes in the expression of MOR a TLR4 after chronic morphine by SDS-PAGE electrophoresis. Results of these experiments did not reveal any changes in the expression of MOR and TLR4 after using morphine. Despite blockade of MOR and TLR by specific antagonists, the expression of these proteins was not altered. In the end, we studied changes in the expression of members of MAPK signalling pathway which are connected with MOR and TLR4 signalling. We did not observe any significant changes in the expression of selected proteins involved in MAPK signalling pathway after chronic morphine.

Results of this thesis suggest that morphine has protective effect on cell viability against oxidative stress. Mainly TLR4 participate in this protective effect of morphine. Chronic morphine apparently do not influence the expression of both receptors and members of MAPK signaling pathway as well.

**Key words:** morphine, protection, oxidative stress, tBHP, MOR, TLR4, MAPK

## Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract .....	5
Obsah .....	6
Seznam zkratk .....	7
1 Úvod.....	9
2 Literární přehled .....	10
2.1 SH-SY5Y buněčná linie .....	10
2.1.1 Diferenciace pomocí RA.....	11
2.2 Mí-opioidní receptory (MOR) a jejich signální dráhy .....	12
2.3 Toll-like 4 receptory (TLR4) a jejich signální dráhy.....	15
2.4 Vliv aktivace MOR a TLR4 na imunitní odpověď .....	18
2.5 Oxidativní stres .....	19
2.6 Morfin a jeho vliv na oxidativní stres.....	21
3 Cíle práce .....	23
4 Materiál a metody .....	24
4.1 Kultivace buněk.....	24
4.1.1 Nediferencované buňky.....	24
4.1.2 Diferenciace buněk.....	25
4.1.3 RNA interference.....	25
4.1.4 Ovlivnění diferencovaných buněk morfinem .....	26
4.1.5 Test oxidativního stresu na viabilitu buněk .....	27
4.1.6 Sklizení buněk .....	28
4.2 Určení koncentrace proteinů.....	29
4.3 SDS-PAGE elektroforéza.....	30
4.3.1 Elektroforetická separace proteinů .....	30
4.3.2 Western blot.....	32
5 Výsledky .....	35
5.1 Ověření diferenciace SH-SY5Y buněk .....	35
5.2 Vliv morfinu na viabilitu buněk po působení oxidativního stresu.....	37
5.3 Role MOR a TLR4 v protektivním působení morfinu .....	39
5.4 Vliv chronického morfinu na MOR, TLR4 a signální dráhu MAPK .....	45
6 Diskuze .....	50
7 Závěr .....	55
8 Seznam použité literatury.....	56

## Seznam zkratek

<b>zkratka</b>	<b>název anglicky</b>	<b>název česky</b>
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma 2	lymfom B-buněk
<b>BDNF</b>	brain-derived neurotrophic factor	mozkový neurotrofický faktor
<b>BSA</b>	bovine serum albumin	hovězí sérový albumin
<b>CaMKII</b>	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase	Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin-dependentní kináza
<b>cAMP</b>	cyclic adenosine monophosphate	cyklický adenosinmonofosfát
<b>CAT</b>	catalase	kataláza
<b>CREB</b>	cAMP response element binding protein	protein vázající cAMP-responzivní element
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid	dimetylsulfoxid
<b>ERK</b>	extracellular signal-regulated kinase	extracelulárním signálem řízená kináza
<b>FBS</b>	fetal bovine serum	fetální hovězí sérum
<b>GPCR</b>	G-protein-coupled receptors	receptory spřažené s G-proteiny
<b>GPx</b>	glutathione peroxidase	glutathionperoxidáza
<b>GSH</b>	glutathione	glutathion
<b>I-κB</b>	inhibitor of NF-κB	inhibitor NF-κB
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun N-terminální kináza
<b>LPS</b>	lipopolysaccharide	lipopolysacharid
<b>MAPK</b>	mitogen-activated protein kinases	mitogenem aktivované proteinkinázy
<b>MOR</b>	mu-opioid receptor	mí-opioidní receptor
<b>MTT</b>	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
<b>MyD88</b>	myeloid differentiation primary response protein	myeloidní diferenciační faktor 88

<b>NADH</b>	nicotinamide adenine dinucleotide	nikotinamidadenindinukleotid
<b>NF-κB</b>	nuclear factor-κB	nukleární faktor κB
<b>NO</b>	nitric oxide	oxid dusnatý
<b>NSE</b>	neuron-specific enolase	neuron-specifická enoláza
<b>p-ERK</b>	phosphorylated form of ERK	fosforylovaná forma ERK
<b>PI3K</b>	phosphoinositide 3-kinase	fosfatidylinositol 3-kináza
<b>PKB/Akt</b>	protein kinase B	proteinkináza B
<b>PKC</b>	protein kinase C	proteinkináza C
<b>PLC-β</b>	phospholipase C-β	fosfolipáza C-β
<b>RA</b>	retinoid acid	kyselina retinová
<b>RAR</b>	retinoid acid receptor	receptor pro kyselinu retinovou
<b>RNS</b>	reactive nitrogen species	reaktivní formy dusíku
<b>ROS</b>	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
<b>SOD</b>	superoxid dismutase	superoxiddismutáza
<b>tBHP</b>	tert-Butyl hydroperoxide	tert-butylhydroperoxid
<b>TH</b>	tyrosin hydroxylase	tyrozinhydroxyláza
<b>TIR</b>	Toll/interleukin-1 receptor	Toll/interleukin-1 receptor
<b>TLR4</b>	Toll-like receptor 4	Toll-like receptor 4
<b>TNF-α</b>	tumor necrosis factor-α	tumor nekrotizující faktor α
<b>TPA</b>	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate	12-O-Tetradekanoylforbol-13-Acetát



## 1 Úvod

Alkaloid morfin se řadí do skupiny tzv. přirozených opioidů, které se získávají z makovic máku setého (*Papaver somniferum*). Morfin se díky svým antinocicepčním a sedativním účinkům již po staletí hojně využívá ve zdravotnictví, zejména k tlumení různých druhů chronických bolestí jako jsou kupř. bolesti spojené s nádorovým onemocněním. Dlouhodobé užívání morfinu často vede k závažným vedlejším účinkům jako je závislost a fenomény s ní související, ale způsobuje i neurotoxicitu, apoptózu a mnohé další.

Oxidativní stres, který je charakterizován nadměrnou produkcí reaktivních radikálů, nedostatečnou účinností anti-oxidačních mechanismů a může vést až k apoptotické smrti, je spojován s celou řadou vážných neurodegenerativních onemocnění a syndromů.

Právě morfin je v posledních letech v odborné literatuře často spojován s protektivním působením proti oxidativnímu stresu. Nicméně existují i studie, které naopak upozorňují na jeho pro-oxidativní účinky. Rozdílnost těchto výsledků je patrně dána použitím odlišných koncentrací morfinu, odlišné doby jeho působení a v neposlední řadě i využitím jiného experimentálního modelu.

Morfin své účinky vyvolává ovlivněním signální dráhy opioidních receptorů, zejm. MOR, které patří do rodiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR). Nicméně v poslední době se ukazuje, že morfin může působit i na signální dráhu TLR4, což jsou receptory uplatňující se zejména v imunitním systému. Oba zmíněné receptory jsou schopné aktivovat signální kaskádu MAPK.

Prozkoumání vlivu chronického působení morfinu na přežití neuroblastomových SH-SY5Y buněk vystavených oxidativnímu stresu a objasnění role MOR, TLR4 a signální kaskády MAPK na tomto efektu by mohlo přispět k lepšímu pochopení působení morfinu a jeho využití v rámci mnohých onemocnění spojených s oxidativním stresem.

## 2 Literární přehled

### 2.1 SH-SY5Y buněčná linie

SH-SY5Y buněčná linie představuje lidskou neuroblastomovou linii, která byla získaná v roce 1970 biopsií kostní dřeně čtyřleté dívky s neuroblastomem. Izolované buňky byly pojmenovány SK-N-SH a následně subklonovány do SH-SY, pak do SH-SY5 a nakonec v roce 1978 vznikly třetím subklonováním SH-SY5Y (Biedler et al., 1973). Linie SK-N-SH obsahuje dva buněčné typy, které podléhají tzv. klonálně expanzivnímu modelu. Jedná se o neuroblastomové buňky, tzv. N-typ a epiteliální buňky (S-typ). N- i S-typ jsou v linii společně přítomné, přičemž za určitých podmínek může dojít k tomu, že N-typ se stane dominantním nad S-typem a naopak. Subklonované SH-SY5Y buňky odpovídají N-typu, nicméně i tato linie obsahuje minoritně S-typ buněk (Cohen et al., 2003). SH-SY5Y buňky mají charakteristiky dopaminergních neuronů, tudíž se využívají hojně ve studiu např. Parkinsonovy choroby či neurotoxicity (Xie et al., 2010).

Linie SK-N-SH obsahuje dva buněčné typy, které podléhají tzv. klonálně expanzivnímu modelu. Jedná se o neuroblastomové buňky, tzv. N-typ a epiteliální buňky (S-typ). N- i S-typ jsou společně přítomné, přičemž za určitých podmínek může dojít k tomu, že N-typ se stane dominantním nad S-typem (Cohen et al., 2003). Nediferencované SH-SY5Y buňky mají tendenci růst ve shlucích, mají nepolarizovaná buněčná těla a nízký počet výběžků (Kovalevich and Langford, 2013). Diferenciace vede k přechodu neuroblastomových buněk k plně maturovaným neuronům. Dochází ke změně jejich fenotypu na fenotyp s dlouhými větvíci se výběžky a snižuje se jejich schopnost proliferace (Dwane et al., 2013; Forster et al., 2016). Diferencované SH-SY5Y buňky vykazují buněčné markery plně maturovaných nervových buněk. Mezi tyto markery patří např. protein asociovaný s mikrotubuly, synaptofysin, neuron-specifická enoláza (NSE), tyrosinhydroxyláza (TH) (Shiple et al., 2016). Podle výběru diferenciační metody je možné buňky transformovat do požadovaného fenotypu, tím může být cholinergní, adrenergní či dopaminergní fenotyp. Mezi nejčastěji používané mediátory diferenciace patří *all-trans*-retinová kyselina (RA), mozkový neurotrofický faktor (BDNF), které jsou často vzájemně kombinované (Encinas et al., 2000; Teppola et al., 2016), dále 12-O-tetradekanoyl-13-forbol acetát (Akerman et al., 1984). Mezi méně používané látky patří pak cholesterol, vitamín D3. Použití RA v kombinaci s cholesterolem, 12-O-tetradekanoyl-13-forbol acetátem nebo BDNF zvyšuje diferenciační potenciál RA, než samotné působení RA. (Agholme et al., 2010; Arcangeli et al., 1999; Moore et al., 1994; Sarkanen et al., 2007; Teppola et al., 2016).

U diferencovaných SH-SY5Y buněk byla prokázána přítomnost MOR, které tvoří přibližně 70% všech opioidních receptorů buňky (Gach et al., 2010; Kazmi and Mishra, 1987). Tento typ buněk také exprimuje TLR4 (Lawrimore and Crews, 2017).

### 2.1.1 Diferenciace pomocí RA

RA je derivát vitamínu A. Jedná se o morfogen, který je důležitý pro vývoj kostry a orgánů u strunatců. *All-trans* RA působí přes jaderné receptory pro retinovou kyselinu (RAR). Encinas a spol. prokázali, že diferenciace SH-SY5Y buněk pomocí RA v délce 5 dnů mění N-typ buněk k charakteristikám neuronálních buněk, zatímco S-typ neprochází morfologickou změnou. Pokud však diferenciace přesáhne 10 dní, tak S-typ přeroste kulturu (Encinas et al., 2000). Molekulární mechanismy vedoucí k diferenciaci buněk nejsou dodnes zcela objasněny. Jedním ze známých mechanismů je zastavení buněčného cyklu na přechodu mezi G0 a G1 fází. Byla dokázána zvýšená exprese inhibitorů cyklin-dependentní kinázy p21 a p27, které zabraňují přestupu buňky z G1 do S fáze a tudíž zabraňují proliferaci. Dále bylo prokázáno, že důležitou roli hraje fosfatidylinositol 3-kináza/proteinkináza B (PI3K/PKB) dráha, proteinkináza C (PKC) a c-Jun N-terminální kináza 1 (JNK1) (Cheung et al., 2009; Miloso et al., 2004; Qiao et al., 2012; Shipley et al., 2017; Yu et al., 2003). Existují studie, které poukazují na to, že vedle mechanismů diferenciace závislých na RAR jsou i mechanismy nezávislé na RAR. Tyto mechanismy jsou závislé na produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) (Kunzler et al., 2017). Bylo prokázáno, že RA indukuje produkci ROS přes sníženou mitochondriální nikotinadenindinukleotid oxidaci. Použití antioxidantů inhibuje diferenciaci. ROS následně aktivují signální dráhu Akt a extracelulárním signálem řízenou kinázu (ERK), které, jak bylo zmíněno, výše, hrají roli v procesu diferenciace (Kunzler et al., 2017).

Diferenciace pomocí RA vede k vyššímu přežívání buněk a snižuje náchylnost buněk k neurotoxinům na rozdíl od buněk nediferencovaných. Děje se tak patrně indukci Akt signální dráhy, up-regulací anti-apoptického proteinu lymfom B-buněk (Bcl-2), nebo pomocí mitochondriálního enzymu superoxiddismutázy (MnSOD), jehož množství bylo zvýšeno (Cheung et al., 2009; Shipley et al., 2016). Byl též naměřen zvýšený membránový potenciál mitochondrií po působení RA (Schneider et al., 2011). Jak patrně, jsou zde dva protiklady, dle některých autorů diferenciace pomocí RA vede k produkci ROS, ale dle jiných naopak zvyšuje odolnost vůči oxidativnímu stresu. Díky vyšší odolnosti někteří autoři považují použití diferencovaných buněk ve studiu neurotoxicity např. Parkinsonovy choroby za nevhodné (Cheung et al., 2009).

Nicméně jiní autoři poukazují na to, že diferenciací RA vede k zastavení buněčného cyklu, tudíž zůstává konstantní počet buněk, což je s výhodou při použití testů buněčné viability. Navíc RA může mimikovat prostředí astrocytů, kdy astrocyty podporují okolní neurony tím, že produkují různé růstové faktory jako BDNF, který je schopen aktivovat Akt signální dráhu. Jak bylo uvedeno výše, RA také indukuje Akt dráhu a tak potvrzuje platnost tohoto buněčného modelu (Luchtman and Song, 2010).

V souvislosti s MOR bylo prokázáno, že diferenciací vede ke zvýšení exprese mRNA pro MOR u SH-SY5Y buněk (Jenab and Inturrisi, 2001).

## 2.2 Mí-opioidní receptory (MOR) a jejich signální dráhy

Alkaloid morfin se získává ze zaschlé šťávy makovic máku setého (*Papaver somniferum*). Řadí se do skupiny opioidů, které jsou charakteristické výraznými antinocicepčními, analgetickými a antitusickými účinky, díky kterým nacházejí široké uplatnění ve zdravotnictví. Endogenní opioidy, kam se řadí endorfiny, enkefaliny a dynorfiny, jsou vytvářeny organismem samotným a jsou důležité pro jeho regulaci. Opioidy se váží ke třem typů GPCR - mí, kappa a delta (Chartoff and Connery, 2014; Childers, 1997; Knapp et al., 1995).

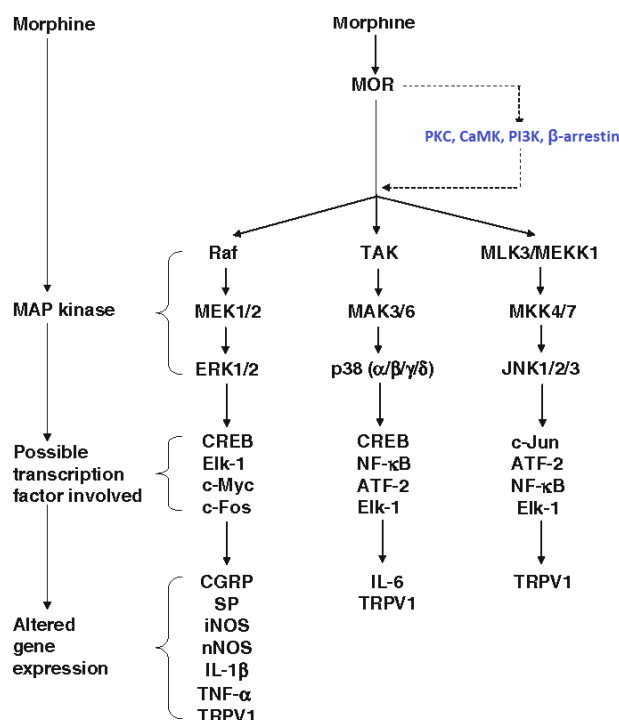
MOR jsou složeny ze 7 transmembránových helixů, 3 extracelulárních a 3 intracelulárních smyček. N-konec se nachází na extracelulární straně a C-konec v cytoplazmě. Hlavním vazebným místem trimerního G-proteinu na MOR je třetí intracelulární smyčka. Morfin se váže do hluboké vazebné kapsy, kde tvoří vodíkovou vazbu s H297 a zároveň se váže pomocí van der Waalsových slabých vazebných interakcí s G325, I296 a M151. Druhá extracelulární smyčka částečně překrývá vazebnou kapsu a tím přímo interaguje s ligandem. Vazba ligandu vede ke konformační změně, která hlavně spočívá v posunu transmembránového helixu VI vzhledem k transmembránovému helixu III, což vede ke ztrátě klíčové interhelikální vodíkové vazby R165-T279 mezi dvěma různými transmembránovými úseky. Tato vodíková vazba je indikátorem neaktivního stavu receptoru (Chen et al., 1993; Cong et al., 2015; Pogozheva et al., 1998).

Kanonická signalizace MOR zahrnuje aktivaci inhibičních G-proteinů ( $G_i/o$ ), což vede k disociaci heterotrimerického komplexu G-proteinu. Akutní působení morfinu inhibuje skrze  $G\alpha$  podjednotku aktivitu adenylátcyklázy, tudíž i množství druhého posla cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Dlouhodobé podávání morfinu avšak vede ke kompenzačnímu zvýšení aktivity adenylátcyklázy a hladina cAMP se vrací k původním hodnotám.

MOR inhibují také pomocí G-proteinu napěťově řízené  $\text{Ca}^{2+}$  kanály, což působí snížení neuronální excitability a výlevu neurotransmiteru. Dalším mechanismem snížení neuronální excitability je aktivace G-proteinem aktivovaných dovnitř usměrňujících  $\text{K}^+$  kanálů (Childers, 1991; Waldhoer et al., 2004).

Morfin kromě výše zmíněné klasické signální kaskády aktivuje i MAPK (Bilecki et al., 2005). MAPK jsou serin/treoninové kinázy, které se podílí na regulaci buněčné proliferace, diferenciace, přežívání, ale také učení a paměti a hrají roli i v morfinové závislosti (Roux and Blenis, 2004). Rodina MAPK zahrnuje 3 hlavní skupiny. Jedná se o ERK1/2, p38, JNK. ERK1/2 se uplatňují zejména v reakci na různé mitogeny a podporují přežití buněk a jejich proliferaci, naopak p-38 jsou aktivovány hlavně stresovými stimuly a vyvolávají u buněk stresovou reakci (Roux and Blenis, 2004).

Není zcela jasné, jakým způsobem MOR aktivují MAPK. Dle souborného článku Luttrella a Millera se zdá, že důležitou roli v aktivaci MAPK hraje  $\beta$ -arrestin, který slouží jako lešení (scaffold) pro MAPK (Luttrell and Miller, 2013). V této souvislosti bylo ukázáno, že po zablokování G-proteinu, aktivace receptorů následné  $\beta$ -arrestinové signalizace nevedlo k aktivaci ERK (Grundmann et al., 2018). Zheng a spol. uvádí, že morfin aktivuje ERK1/2 cestou PKC, ale ne  $\beta$ -arrestinů (Zheng et al., 2008). V úvahu dále připadá spolu s PKC i  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-dependentní proteinkináza (CaMK), které následně aktivují Raf, což vede k aktivaci Ras a v konečném důsledku MAPK (Bilecki et al., 2005). Určitou roli by mohla hrát i signální dráha JNK/stresem aktivované proteinkinázy. Bylo prokázáno, že chronické působení morfinu vede k jejich aktivaci. Aktivované JNK/ stresem aktivované proteinkinázy následně rozpojují signální kaskádu MAPK v bodě MEK-ERK, a tím zabraňují následné aktivaci ERK (Bilecki et al., 2005). Jiní autoři přikládají aktivaci MAPK působení PI3K, která aktivuje Ras, Raf a následně MEK (Wandong et al., 1999) (Obr. 1). Studie Bechlevy a spol. popisuje ovlivnění ERK transaktivací mezi MOR a receptory pro růstové faktory. Kdy se  $\text{Ca}^{2+}$ -vazebný protein odpojí od MOR a aktivuje PLC, která generuje PKC $\epsilon$  (Bechleva et al., 2005). Přepokládané dráhy stimulace MAPK morfinem jsou znázorněny na obr. 1.



Obr. 1.: Schéma signální kaskády MAPK a možné mechanismy její aktivace vyvolané aktivací MOR (upraveno podle Chen and Sommer, 2009).

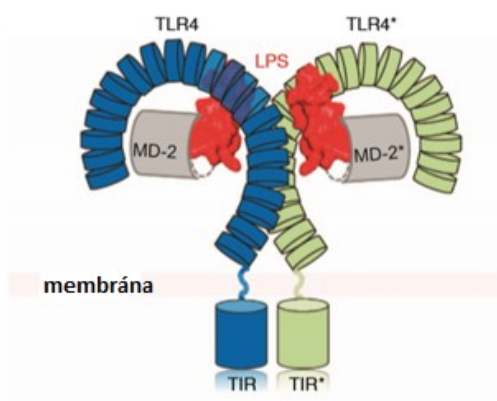
Jednou z nejsledovanějších signálních molekul MAPK signální dráhy je ERK. Akutní expozice nediferencovaných SH-SY5Y buněk morfinem vedla k fosforylaci ERK (pERK) během několika minut, návrat na původní hladinu proběhl do 30-60 minut od podání morfinu (Bilecki et al., 2005; Trapaidze et al., 1999). Nicméně Moulédous a spol. uvádějí, že k aktivaci pERK po akutní expozici morfinu dochází pouze u gliálních buněk, nikoliv u nediferencovaných SH-SY5Y (Mouledous et al., 2004). Ovlivnění buněk morfinem po dobu 3 dní (chronické působení) způsobilo naopak snížení hladiny pERK pod kontrolní hodnotu (Bilecki et al., 2005), ale Moulédous a spol. uvádí, že chronické působení opioidů nevedlo ke změně v množství pERK u gliálních ani nediferencovaných SH-SY5Y buněk (Mouledous et al., 2004). Množství nefosforylovaného ERK se po chronickém morfinu nemění (Bilecki et al., 2005). Rozdílnost výsledků dvou studií patrně tkívá v odlišné době působení opioidů. První z výše jmenovaných studií použila protokol, ve kterém byly neuroblastomové buňky ovlivňovány po dobu 3 dní (Bilecki et al., 2005), zatímco autoři druhé ze studií ovlivňovali buňky po dobu 7 dní (Moulédous et al., 2004). Dále ve druhé studii byl použit k ovlivnění buněk opioid fentanyl, místo morfinu (Moulédous et al., 2004).

Co se týče *in vivo* pokusů na potkaním modelu, bylo zjištěno, že chronické podávání morfinu způsobuje zvýšení celkového množství ERK v locus coeruleus, nucleus caudatus, putamen a její aktivní formy pERK ve ventrální tegmentální oblasti, naopak v nucleus accumbens chronická i akutní expozice morfinem vedla ke snížení pERK (Berhou et al., 1996; Eitan et al., 2003; Lin et al., 2010; Ortiz et al., 1995). V kortikálních oblastech mozku a locus coeruleus akutní podání morfinu způsobilo zvýšení pERK (Eitan et al., 2003).

### **2.3 Toll-like 4 receptory (TLR4) a jejich signální dráhy**

Dosud bylo popisováno působení morfinu pouze klasicky přes opioidní receptory, zejm. MOR, nicméně v poslední době byl prokázán účinek morfinu i ovlivněním signální kaskády TLR, hlavně TLR4 (Hutchinson et al., 2010; Stevens et al., 2013; Wang et al., 2012; Watkins et al., 2009). TLR jsou receptory, které se podílejí na vrozené imunitní odpovědi. Toll receptor byl původně objeven u *Drosophily* jako receptor nezbytný pro určení dorso-ventrální osy vyvíjejících se embryí. Později byly určeny homology Toll receptorů i u savců a pojmenovány Toll-like receptory. TLR se nachází typicky na povrchu imunitních buněk, jako jsou makrofágy, neutrofily, dendritické buňky apod., ale jsou přítomné i u glií a neuronů (Watkins et al., 2009). Do dnešní doby bylo identifikováno 10 lidských receptorů (TLR1-10) a 12 myších (Moresco et al., 2011). Tyto receptory rozpoznávají molekulární vzory, které jsou typicky konzervované mezi patogeny. TLR4 odpovídají na lipopolysacharid (LPS) z membrány Gramnegativních bakterií, endogenně na proteiny teplotního šoku (heat shock proteiny), TLR2 jsou aktivovány lipopeptidy, TLR5 bakteriálními flageliny, TLR3 virovou dsDNA, TLR7 a TLR8 virovou nebo bakteriální ssRNA. Odpovědí aktivovaných receptorů je produkce prozánětlivých cytokinů, např. tumor-nekrotizujícího faktoru- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukinů 1 a 6, interferonů a maturace antigen prezentujících buněk. Ačkoliv jsou tyto receptory schopny rozeznat velké množství ligandů, mají podobnou strukturu. Obsahují extracelulární ligand-vazebnou doménu, která má typicky podkovovitý tvar. Její konkávní strana je tvořena  $\beta$ -listy a konvexní strana  $\alpha$ -helixy a smyčkami. Tato doména je bohatá na aminokyselinu leucin. Dále TLR obsahují transmembránovou část a intracelulární Toll/interleukin-1 receptorovou (TIR) doménu, která je důležitá pro transdukcí signálu (Park and Lee, 2013). TLR4 jsou nicméně v mnohých aspektech specifické a odlišné od ostatní typů TLR. Pro aktivaci receptoru např. LPS je nutná přítomnost ko-receptoru, MD-2 proteinu. MD-2 se váže s TLR4 pomocí vodíkových vazeb na konkávní straně extracelulární domény.

MD-2 je tvořen  $\beta$ -listy, které tvoří hydrofobní kapsu, do které se váže ligand. Receptor je v klidovém stavu tvořen dimerem TLR4 a MD-2. Vazba ligandu vede ke spojení dvou dimerů TLR4-MD-2 (Obr. 2). Transmembránová část je tvořena jedním  $\alpha$ -helixem. Intracelulární část obsahuje 187 aminokyselinových zbytků a její důležitou součástí je TIR doména, k níž se váží svými TIR doménami adaptorové proteiny jako jsou myeloidní diferenciační faktor 88 (MyD88), adaptorový protein indukující interferon  $\beta$ , které spouští intracelulární signální kaskády (Botos et al., 2011; Jin and Lee, 2008; Kim et al., 2007; Park and Lee, 2013).

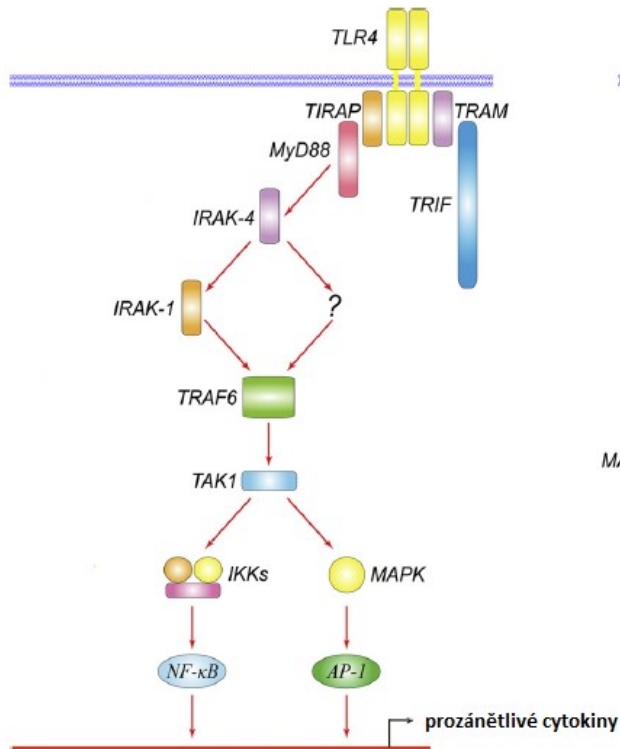


Obr. 2: Stavba TLR4 a jeho ko-receptoru MD-2 s navázanou molekulou LPS (upraveno dle Park and Lee, 2013).

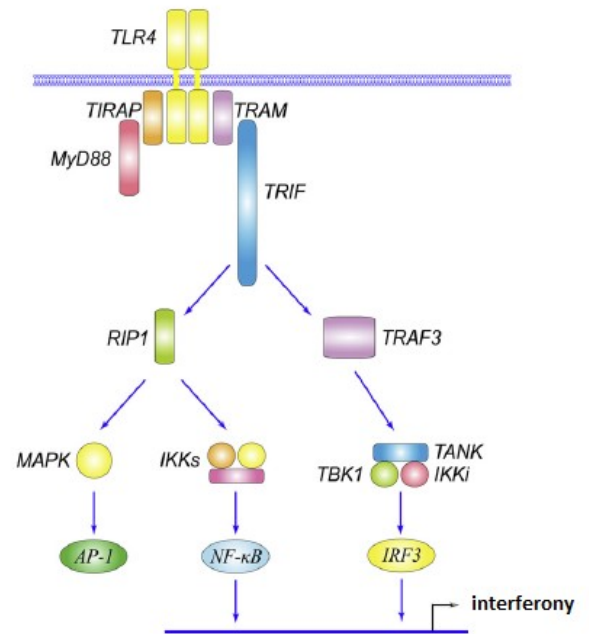
Navázání agonisty na TLR4 receptor vede ke spuštění dvou signálních kaskád, které se liší přítomností prvního adaptorového proteinu. Jedná se o MyD88-dependentní a MyD88-independentní dráhu. MyD88-dependentní dráha je společná všem TLR, ale MyD88-independentní dráha je přítomná pouze u TLR4 a TLR3. Tyto dráhy se liší také v odpovědi, kterou vyvolávají. MyD88-dependentní dráha vede k časně aktivaci NF- $\kappa$ B, který v jádře spouští translaci prozánětlivých cytokinů a chemokinů. MyD88-independentní dráha spouští pozdní aktivaci NF- $\kappa$ B. Další signální drahou aktivovanou TLR4 je i MAPK (Lu et al., 2008) (Obr. 3).



### MyD88-dependentní dráha



### MyD88-independentní dráha



Obr. 3: MyD88-dependentní a MyD88-independentní signální dráha TLR4. Zkratky: MyD88-dependentní signální dráha: TIRAP – adaptorový protein obsahující TIR doménu; TRAM – adaptorový protein podobný TRIF; TRIF – adaptorový protein indukující tvorbu interferonu  $\beta$ ; MyD88 – myeloidní diferenciační faktor 88; IRAK4 – kináza-4 asociovaná s receptorem pro interleukin 1; TRAF6 – faktor-6 asociovaný s TNF receptorem; TAK1 – kináza-1 aktivovaná transformačním růstovým faktorem; TAB1 a TAB2 – TAK vázající proteiny 1 a 2; I- $\kappa$ B – inhibitor NF- $\kappa$ B; MAPK – mitogenem aktivované proteinkinázy; NF- $\kappa$ B – nukleární faktor  $\kappa$ B; AP-1 – aktivační protein 1.

MyD88-independentní dráha: RIP1 – protein 1 interagující s receptorem; TRAF3 – faktor-3 asociovaný s TNF receptorem; TANK – člen rodiny TRAF asociovaný s aktivátorem NF- $\kappa$ B; TBK1 – kináza-1 spojená s TANK; IRF-3 – faktor-3 regulující interferon (upraveno podle: Lu et al., 2008).

TLR4 je schopen vázat jak (-), tak (+) izomer morfinu i naloxonu, čímž se liší od MOR, které jsou citlivé pouze k (-) izomeru morfinu a (-) izomeru naloxonu (Hutchinson et al., 2008; Wang et al., 2016). Morfin a naloxon se vážou do stejného vazebného místa na TLR4 jako LPS, nicméně morfin vykazuje nižší aktivaci TLR4 signalizace než LPS (Grace et al., 2014; Stevens et al., 2013). V mnoha studiích byl prokázán vliv morfinu jak na expresi mRNA pro TLR4, tak i na úrovni exprese proteinu. Morfin v koncentraci  $10^{-5}$ M byl schopen po 24 hodinách působení snížit expresi TLR4 jak na úrovni mRNA, tak proteinu u myších makrofágů. Naltrexon, antagonist opioidních receptorů, naopak zvyšoval hladinu TLR4 (Franchi et al., 2012). U buněk MCF7 bylo zjištěno, že exprese mRNA pro TLR4 byla zvýšena po 24 hodinovém působení morfinu v koncentracích 0,05  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M a 5  $\mu$ M. Naopak koncentrace morfinu 0,005  $\mu$ M způsobila snížení exprese genu pro TLR4 (Javanmard et al., 2018). Akutní (2 hodiny) i chronické (24 hodin) vystavení primárních endoteliálních buněk CNS morfinu působí up-regulaci mRNA pro TLR4 (Wang et al., 2012). Bohužel nejsou dostupné studie, které by se zabývaly vlivem morfinu na expresi TLR4 u SH-SY5Y buněk.

## **2.4 Vliv aktivace MOR a TLR4 na imunitní odpověď**

V současné době je velmi studovanou oblastí zánětlivá reakce v nervové tkáni – neuroinflamace. Z tohoto hlediska morfin vykazuje zajímavé výsledky. Morfin aktivací MOR zvyšuje expresi I $\kappa$ -B, jenž má inhibiční vliv na NF- $\kappa$ B, který jak bylo prokázáno, je důležitý pro transkripci prozánětlivých cytokinů jako je TNF- $\alpha$  (Borner et al., 2012). Jiná studie ukazuje, že naopak metabolit morfinu morfin-3-glukuronid, který je aktivní na TLR4 a není schopen aktivovat opioidní receptory, výrazně zvyšuje hladinu tohoto transkripčního faktoru a (-)izomer morfinu, který má schopnost aktivovat jak MOR, tak i TLR-4 zvyšoval jen nepatrně hladinu NF- $\kappa$ B, což je důkazem vzájemné komunikace (cross-talk) mezi MOR a TLR4. Duální aktivace MOR a TLR4 má opačný účinek na expresi prozánětlivých cytokinů právě skrze NF- $\kappa$ B (Grace et al., 2014). Morfin v nanomolárních koncentracích zesiluje účinek LPS na produkci prozánětlivých cytokinů, naopak mikromolární koncentrace působí zcela opačně, navíc pokud je morfin podán spolu s LPS, tak inhibuje aktivaci TLR4 navozenou LPS (Roy et al., 1998). Agonistický efekt morfinu na TLR4 dosahuje 10% stimulace v porovnání se stimulací LPS, ale antagonistický efekt byl mezi 50 a 80 %. Tímto kompetitivním způsobem morfin vykazuje svůj protektivní účinek přes TLR4. Opioidní agonisté tak vykazují dva účinky – minoritní prozánětlivý a majoritní protizánětlivý.

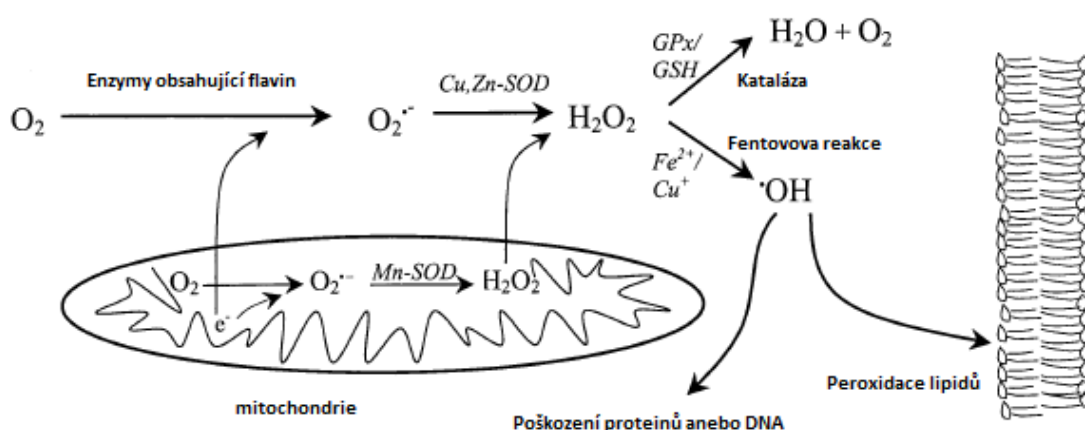
Použití antagonistů MOR jako je naltrexon spolu s LPS blokuje stimulaci TLR4 a produkci prozánětlivých cytokinů (Madera-Salcedo et al., 2013; Stevens et al., 2013; Wang et al., 2015). Bylo prokázáno, že vystavení potkanů opakovaným dávkám morfinu, tzv. morfinový preconditioning, zabraňuje zánětu nervové tkáně navozené následnou dávkou LPS (Rostami et al., 2012). Dalším možným mechanismem propojení drah MOR a TLR4 by mohl být  $\beta$ -arrestin. U mastocytů bylo například prokázáno, že morfin zvyšuje tvorbu komplexu faktoru-6 asociovaného s TNF receptorem a  $\beta$ -arrestinu, což koreluje s inhibicí produkce TNF- $\alpha$  mastocyty (Madera-Salcedo et al., 2013).

## 2.5 Oxidativní stres

Oxidativní stres je nerovnováha v redoxní homeostáze, charakteristická masivní produkcí ROS a reaktivních forem dusíku (RNS), přičemž kapacita antioxidačních mechanismů, které eliminují tyto radikály je překročena. Volný radikál je částice, která má alespoň jeden nepárový elektron, jenž činí tuto částici vysoce reaktivní. ROS je obecný název, který popisuje volné radikály odvozené od molekuly kyslíku. Mezi ROS patří superoxidový radikál ( $O_2^-$ ), hydroxylový radikál ( $OH^\cdot$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ). Do skupiny RNS se řadí oxid dusnatý ( $NO^\cdot$ ), peroxylový radikál ( $ROO^\cdot$ ). ROS ve vyšších koncentracích způsobují poškození makromolekul, jako jsou proteiny, lipidy, DNA a působí celkové snížení buněčné životnosti. Některé z nich, jako kupř. NO, mají i jistý benefiční vliv. NO se uplatňuje jako druhý posel v buněčné signalizaci, podílí se na oxidativním vzplanutí fagocytů a relaxaci hladké svaloviny. Hlavním vnitrobuněčným zdrojem ROS jsou mitochondrie. Udává se, že 1-2 % kyslíku, který mitochondrie spotřebovávají, se přeměňuje na ROS. To se děje zejména na komplexu I a III respiračního řetězce (Lushchak, 2014).

V buňce se vyskytují v zásadě dvě skupiny mechanismů, které za fyziologických podmínek brání poškození buňky volnými radikály. Za prvé jde o působení antioxidačních enzymů jako je superoxiddismutáza, kataláza (CAT), glutathionperoxidáza (GPx), glutathionreduktáza, laktoperoxidáza. Druhou skupinou je neenzymový antioxidační systém zahrnující molekuly působící jako scavengery, např. glutathion (GSH) nebo jsou to molekuly vitamínů. Typicky vitamín A chrání membrány před lipoperoxidací, vitamín C naopak působí uvnitř buňky (Apel and Hirt, 2004; Lushchak, 2014).

Superoxidový radikál vzniká odtržením jednoho elektronu z molekuly kyslíku. Tvoří se zejm. v respiračním řetězci, ale také pomocí tzv. flavoenzymů jako jsou xanthinoxidáza, lipoxygenáza, cyklooxygenáza. Superoxid není vysoce reaktivní, postrádá schopnost penetrovat lipidové membrány. Dvě molekuly superoxidu jsou přeměněny na peroxid vodíku pomocí SOD. Existují dva izoenzymy využívající odlišné kofaktory ke své funkci. Mn-SOD, využívající mangan, se nachází v mitochondriích a Cu/Zn-SOD, využívající měď/zinek, v cytosolu. Peroxid vodíku má schopnost penetrovat membránami a působit jejich poškození, zejm. oxiduje polynenasycené mastné kyseliny. Jedním z produktů oxidace mastných kyselin je malondialdehyd, který je pro savčí buňky mutagenní (Niedernhofer et al., 2003). Peroxid vodíku hraje také důležitou roli meziproductu v produkci dalších radikálů. Následně je zpracován na molekulu vody enzymem CAT. Jedná se o hemoprotein, který se nachází převážně v peroxizomech. Dalším enzymem, který je schopen zpracovat molekulu peroxidu vodíku je GPx, jejíž součástí je GSH. GSH je tripeptid skládající se z L-gama-glutamyl-L-cysteinyl-glycinu. Aktivní formou je redukovaný GSH, který je během glutathionoxidázové reakce přeměňován na glutathiondisulfid. Zpětná reakce je katalyzována NADPH-dependentním flavoenzymem glutathionreduktázou. V přítomnosti kovových iontů dochází ke vzniku velice reaktivního a nebezpečného hydroxylového radikálu pomocí tzv. Fentonovy reakce (Apel and Hirt, 2004; Lushchak, 2014). Přehled jednotlivých reakcí je na obr. 4.



Obr. 4: Schéma vzniku reaktivních forem kyslíku. Zkratky: SOD – superoxiddismutáza; GPx - glutathionperoxidáza; GSH – glutathion (upraveno dle Nordberg and Arnér, 2001).

## 2.6 Morfin a jeho vliv na oxidativní stres

Tato práce se snaží objasnit roli chronického působení morfinu v podmínkách navození oxidativního stresu, jelikož se ukazuje, že morfin hraje zřejmě duální roli v reakci na oxidativní stres. Byl prokázán jak jeho protektivní, tak jeho pro-oxidativní účinek, většinou v závislosti na jeho použité koncentraci. Dle dostupné literatury se nedá jednoznačně rozhodnout, v jakém rozmezí koncentrací je působení morfinu protektivní, resp. pro-oxidativní. Zdá se, že účinek morfinu na oxidativní stres závisí na zvoleném experimentální modelu.

Morfin vykazuje své protektivní účinky buď mechanismy závislémi na opioidních receptorech a/nebo mechanismy nezávislémi na opioidních receptorech (Lee et al., 2004; Qian et al., 2007; Škrabalová et al., 2013). Patrně se bude jednat o více mechanismů, které se mohou kombinovat v závislosti na konkrétních podmínkách jako je druh organismu/buněčný typ, věk, pohlaví organismu, typ tkáně a orgánu, dávkování, doba užívání a současné podávání jiných drog.

Protektivní mechanismy nezávislé na opioidních receptorech zahrnují např. působení morfinu jakožto scavengeru. Studie Lee a spol. prokázala, že scavengerový účinek morfinu je závislý na jeho koncentraci, přičemž nejvyšší scavengerové aktivity bylo dosaženo v koncentraci morfinu 200  $\mu\text{M}$  (Lee et al., 2004). Ostatní studie prokázaly také scavengerový účinek morfinu avšak v nižším rozmezí koncentrací 5-10  $\mu\text{M}$  (Costa-Malaquias et al., 2014). Mezi další non-opioidní mechanismy působení morfinu patří inhibice enzymu NADPH oxidázy, resp. inhibice jeho správného složení (Qian et al., 2007).

V případě protektivního účinku morfinu závislého na MOR bylo zjištěno, že morfin v potkaních astrocytech zprostředkovává protekci přes signální kaskádu zahrnující G-protein a PI3K, která aktivuje MAPK signální kaskádu a skrze ni anti-apoptotický signál, ale je také spojována s PKB/Akt, která vykazuje svůj anti-apoptotický efekt skrze inhibici pro-apoptotického mitochondriálního proteinu Bad, nutno podotknout, že u jiných buněčných typů (C6 gliomové buňky, HL-60 a PC12) byl morfin bez vlivu, ačkoliv zmíněné buněčné typy exprimují MOR (Franke et al., 1997; Kim et al., 2001). Z pohledu nových poznatků o možnosti morfinu aktivovat TLR4 je možné, že protektivní účinek může být zprostředkován i přes tyto receptory. V případě SH-SY5Y buněk bylo prokázáno, že morfin inhibuje produkci ROS navozenou antitumorní látkou doxorubicinem. Morfin zde inhiboval aktivaci kaspázy-3, zabraňoval výlevu cytochromu c a měnil hladinu proapoptotického proteinu Bax a antiapoptotického proteinu Bcl-2 (Lin et al., 2007). K podobnému výsledku dospěli i Cao a spol. u rakovinových CNE-2 buněk.

Zjistili, že nižší dávky morfinu vedou k inhibici aktivity kaspázy-3 a zvyšují poměr anti-apoptotického/pro-apoptotického proteinu Bcl-2/Bax (Cao et al., 2016).

Mnohé studie se shodují, že pro-oxidativní účinek morfinu je většinou navozen jeho chronickým působením (Cao et al., 2016; Payabvash et al., 2006; Samarghandia et al., 2014; Zhou et al., 2011). Nicméně Guzmán a spol. prokázali pro-oxidativní účinek i po 60 minutovém působení morfinu (Guzmán et al., 2006; Guzmán et al., 2009). Morfin vykazuje své pro-oxidativní účinky prakticky dvěma cestami. Jednak působí negativně na antioxidační systém, zejm. na antioxidační enzymy, nebo podporuje produkci volných radikálů. Tvorba radikálů vede k aktivaci vnitřní cesty apoptózy (Hu et al., 2002). Morfin svým působením snižuje aktivitu enzymů CAT, GPx a SOD. Podkladem tohoto snížení aktivity může být redukce zásoby cysteinu jakožto jedné ze součástí GPx a/nebo zvýšená spotřeba GSH na přímý radikálový scavengering (Guzmán et al., 2009; Guzmán et al., 2006; Payabvash et al., 2006; Samarghandian et al., 2014; Zhang et al., 2004; Zhou et al., 2011). Snížená hladina GSH byla také zjištěna v mozkové tkáni po akutním působení morfinu, stejně tak v cerebrospinální tekutině (Goudas et al., 1993; Guzmán et al., 2006).

V případě morfinem zprostředkované produkce volných radikálů bylo zjištěno, že morfin je schopen stimulovat tvorbu superoxidu u mesangiálních buněk ledvin (Singhal et al., 1994). ROS jsou produkovány také SH-SY5Y buňkami v odpovědi na chronické působení morfinu, přičemž důležitou roli má JNK, která snižuje expresi anti-apoptotického proteinu Bcl-2 a naopak zvyšuje produkci pro-apoptotického proteinu Bim (Lin et al., 2009). Morfinem zprostředkovaná down-regulace anti-apoptotického proteinu Bcl-2 vede k apoptotické smrti (Boronat et al., 2001). U rakovinových CNE-2 buněk bylo zjištěno, že morfin ve vyšších koncentracích zvyšuje aktivitu kaspázy-3 a snižuje poměr pro-apoptotického/anti-apoptotického proteinu Bax/Bcl-2 (Cao et al., 2016). Morfin působí apoptózu i buněk imunitního systému, jako jsou kupř. makrofágy, kdy se podle dostupných studií předpokládá, že morfin svůj efekt zprostředkovává stimulací enzymu NADPH oxidázy a tudíž tvorby superoxidu, který poškozuje buňky (Bhat et al., 2004).

### **3 Cíle práce**

- 1) Diferencovat neuroblastomové SH-SY5Y buňky do plně maturovaných nervových buněk.
- 2) Stanovit vliv chronického působení morfinu na viabilitu diferencovaných buněk vystavených oxidativnímu stresu tBHP.
- 3) Objasnit účast MOR a TLR4 ve vlivu morfinu na viabilitu diferencovaných SH-SY5Y buněk po působení oxidativního stresu
- 4) Analyzovat změny v expresi vybraných členů signální kaskády MAPK vyvolané chronickým působením morfinu.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Kultivace buněk

Tab. 1: Roztoky použité pro práci s buňkami

<b>Kultivační médium</b>	DMEM/F-12 v poměru 1:1  (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham, Sigma-Aldrich)
<b>PBS</b>	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> doplněno dH <sub>2</sub> O do 1000 ml; pH 7,4
<b>Trypsin/EDTA</b>	5g prasečího trypsinu
<b>10x koncentrovaný</b>	2 g EDTA-4Na <sub>4</sub> (kyselina ethylendiamintetraoctová) doplněno 0,9% NaCl do 1000 ml
<b>TMES</b>	20mM Tris (pH = 7,4) 3 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EDTA 250 mM sacharóza

Pro účely diplomové práce byla použita linie lidských neuroblastomových buněk SH-SY5Y (American Type Culture Collection). Buňky byly kultivovány při 37°C a 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Pro testování byly použity buňky z 8-15 pasáže. Roztoky potřebné pro kultivaci buněk jsou uvedené v Tab. 1.

#### 4.1.1 Nediferencované buňky

Nediferencované SH-SY5Y buňky byly kultivovány v plastových lahvích s velikostí povrchu 75cm<sup>2</sup> (Thermo Fisher Scientific) v 10 ml kultivačního média, které bylo obohaceno o 10% roztok fetálního hovězího séra (FBS, Gibco) a 1% roztok antibiotik a antimykotik (Sigma-Aldrich).



Výměna média probíhala každé 2-3 dny. Při dosažení 80-90 % konfluence byly buňky pasážovány roztokem Trypsin/EDTA (Sigma Aldrich) ředěným PBS v poměru 1:10. Poté, co se buňky pustily dna lahve, bylo přidáno médium s FBS, které obsahuje přirozený inhibitor trypsinu. Následně byly buňky sedimentovány v centrifuze Hettich Universal 30R při 1250 rpm, 3 min. a pokojové teplotě. Získané buňky byly resuspendovány potřebným množstvím média a nasazeny do nových lahví.

#### **4.1.2 Diferenciace buněk**

SH-SY5Y buňky byly diferencovány v kultivačním médiu s přidavkem 1% FBS. Diferenciace byla navozena RA v koncentraci 10  $\mu$ M (Sigma Aldrich). RA byla rozpuštěna v dimetylsulfoxidu (DMSO, Sigma-Aldrich) a skladována při -78°C. Diferenciace probíhala po dobu 6 dní, přičemž médium s RA bylo vyměňováno každé dva dny. Kultivace buněk i výměna média probíhala ve tmě, protože RA je citlivá ke světlu. Buňky byly diferencovány pro následné pokusy jednak v kultivačních lahvích s velikostí povrchu 75cm<sup>2</sup> (Thermo Fisher Scientific) a jednak v 96-jamkových destičkách (Biolife). Optimální množství buněk pro diferenciaci v kultivačních lahvích bylo při 50% konfluenci. Pro diferenciaci buněk v destičkách bylo nejprve spočítáno množství buněk v Bürkerově komůrce a následně byly buňky vysazeny v počtu 30 000/jamku. Kultivace probíhala ve 100  $\mu$ l kultivačního média v jamce.

#### **4.1.3 RNA interference**

Snížení exprese MOR probíhalo metodou RNA interference. K RNA interferenci byl použit Lipofectamin RNAiMAX transfekční reagent (Invitrogene) a siRNA proti MOR (katalog. č. sc-35957, Santa Cruz Biotechnology) a kontrolní siRNA (katalog. č. 4390846, Invitrogene). Vystaveny příslušným siRNA byly diferencované buňky jak pěstované v kultivačních lahvích, tak v 96-jamkových destičkách. Příprava reakčních roztoků a samotné provedení RNA interference probíhalo podle protokolu k Lipofectaminu RNAiMAX s dvojnásobným množstvím lipofektaminu a také siRNA. Snížení exprese MOR v buňkách pomocí siRNA probíhalo podle níže uvedeného časového schématu (Obr. 6). Přesná použitá množství reagensů jsou uvedena v tab. 2.

Tab. 2: Příprava reagensií pro RNA interferenci

Postup	Komponenty	96-jamková destička celkový objem reagensií potřebný pro 20 jamek* [μl]	Kultivační lahev celkový objem reagensií potřebný pro 1 lahev # [μl]
Rozpuštění Lipofectamine RNAiMAX Reagent v Opti-MEM Medium	<b>Opti-MEM Medium</b>	<b>100</b>	<b>300</b>
	<b>Lipofectamine RNAiMAX Reagent</b>	<b>12</b>	<b>36</b>
Rozpuštění siRNA v Opti-MEM Medium	<b>Opti-MEM Medium</b>	<b>100</b>	<b>300</b>
	<b>siRNA (10 μM)</b>	<b>4</b>	<b>12</b>
Smíchaná siRNA s Lipofectamine RNAiMAX Reagent	<b>siRNA- Lipofectamine RNAiMAX Reagent</b>	<b>200</b>	<b>600</b>

\* Pro pokus bylo využito 20 jamek v jedné destičce s objemem média 100 μl/jamku a ke každé jamce bylo přidáno 10 μl připravené směsi pro RNA interferenci. # Objem média v 1 kultivační lahvi činil 6 ml, ke kterému bylo přidáno 600 μl připravené směsi pro RNA interferenci.

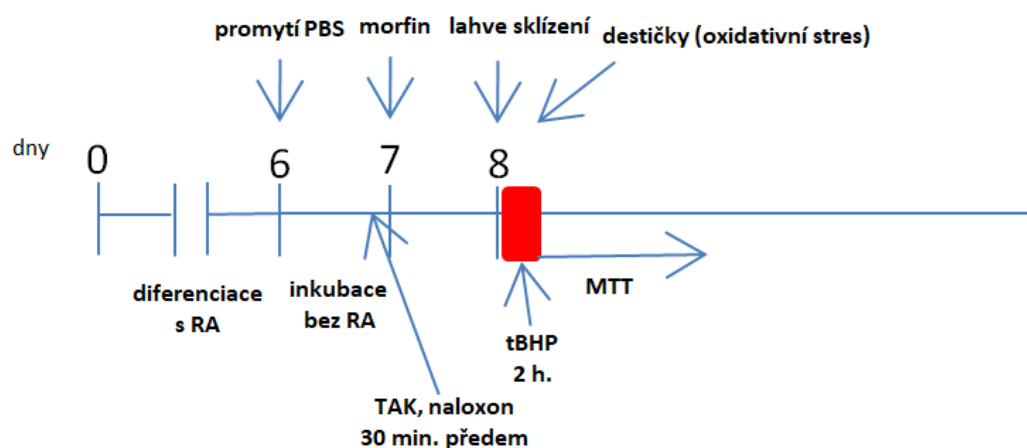
#### 4.1.4 Ovlivnění diferencovaných buněk morfinem

Vliv chronického působení morfinu na buňky byl sledován jak v 96-jamkových destičkách určených pro další testování (kap. 4.1.5), tak v kultivačních lahvích, které byly posléze sklizeny (kap. 4.1.6). Ovlivnění diferencovaných buněk probíhalo podle níže uvedeného časového schématu (Obr. 5 a 6).

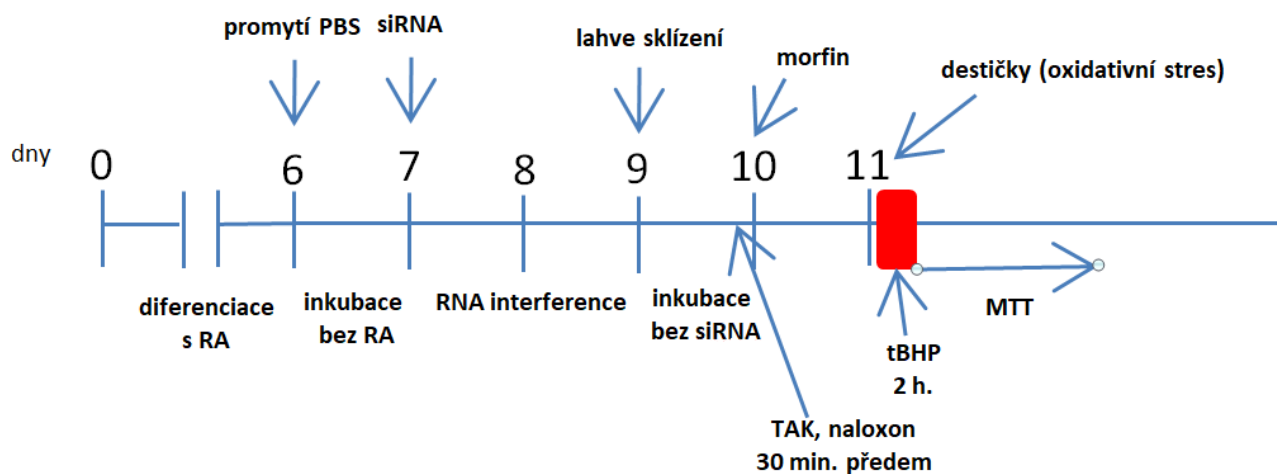
Buňky v destičkách byly ovlivněny morfinem (Sigma Aldrich), v koncentracích 1 mM, 100 μM, 10 μM a 1 μM. Role MOR a TLR4 v účincích morfinu na buňky byla testována pomocí inhibitorů receptorů. Inhibitory receptorů TAK-242 (Merck Millipore) v koncentraci 10 μM a naloxon (Sigma Aldrich) v koncentraci 10 μM byly přidány 30 minut před přidání morfinu. Buňky byly ovlivněny látkami jednotlivě nebo ve vzájemných kombinacích na 24 hodin (Obr. 5).

Buňky v destičkách po RNA interferenci byly ovlivněny pouze morfinem v koncentraci 10 μM na 24 hodin (Obr. 6).

Buňky v kultivačních lahvích byly ovlivněny TAK-242 v koncentraci 10 μM, naloxonem v koncentraci 10 μM a po 30 minutách morfinem ve vybrané koncentraci 10 μM. Ovlivnění probíhalo buď jednotlivě, nebo ve vzájemných kombinacích na 24 hodin (Obr. 5).



Obr. 5: Časové schéma ovlivnění diferencovaných buněk.



Obr. 6: Časové schéma ovlivnění diferencovaných buněk metodou RNA interference.

#### 4.1.5 Test oxidativního stresu na viabilitu buněk

Oxidativní stres byl vyvolán inkubací buněk s tBHP (Sigma Aldrich) v koncentraci 500  $\mu$ M na 2 hodiny u dvou skupin diferencovaných buněk (Obr. 5 a 6). Jednalo se zaprvé o diferencované buňky ovlivněné morfinem, TAK-242 a naloxonem na 24 hodin (kap. 4.1.4) a zadruhé to byly buňky podrobené RNA interferenci (kap. 4.1.3) a posléze ovlivněné morfinem na 24 hodin. Změna ve viabilitě ovlivněných buněk byla následně měřena pomocí MTT testu.

### **MTT test**

MTT test je kolorimetrická metoda, která stanovuje metabolickou aktivitu buněk. Tento test lze využít jako test viability buněk, protože metabolicky aktivní jsou pouze buňky živé. Metoda je založena na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan (fialové krystaly hvězdčovitěho tvaru). Reakce probíhá na mitochondriální membráně pomocí oxidoreduktáz. Krystaly formazanu jsou následně rozpuštěny přidáním detergentu a zbarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky. Hodnota absorbance odpovídá množství metabolicky aktivních buněk.

Po působení tBHP na buňky bylo odsáto 70  $\mu$ l média a přidáno 50  $\mu$ l čerstvého média s 1% FBS a 10  $\mu$ l 12 mM roztoku MTT (Sigma Aldrich) v PBS. Buňky byly inkubovány v rozmezí od 2 do 4 hodin, dokud se nevytvořily tmavé krystaly formazanu. Následně bylo odsáto 75  $\mu$ l média a přidáno 50  $\mu$ l DMSO. Destička byla lehce vortexována a posléze změřena absorbance při vlnové délce 540 nm pomocí spektrofotometru (Synergy HT, Biotek). Získaná data byla vyhodnocena programem Gen5.

Získaná data z MTT testů byla analyzována v programu GraphPad Prism 7.0. Výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SEM z minimálně 6 nezávislých pokusů vykonaných v pentaplikátech. K určení statistické významnosti byla využita jednocestná ANOVA a post hoc Tukey test. Statistická významnost byla určena na hladině  $p < 0,05$ .

#### **4.1.6 Sklizení buněk**

Sklizeny byly jak buňky nediferencované, diferencované, tak diferencované - ovlivněné látkami či RNA interferencí pro následné biochemické analýzy. Z kultivačních lahví bylo odsáto médium a lahve byly okamžitě přesunuty na led. Sklizení buněk probíhalo pomocí mechanické stěrky do vychlazeného PBS. Buňky byly stočeny v centrifuze Hettich Universal 320R, při 4°C, 1800 rpm, 10 min. Odsátím PBS byl získán buněčný pelet. K sedimentovaným buňkám byl přidán vychlazený TMES v objemu 50  $\mu$ l na jednu sklizenou lahev, inhibitor proteáz (Complete Inhibitor Cocktail, Sigma Aldrich) a inhibitor fosfatáz (Phosphatase Inhibitor Cocktail, Sigma Aldrich). Následně byly buňky homogenizovány za využití ultrazvukového sonikátoru (Bandelin Sonoplus) pomocí dvou 5 sekundových pulzů při 50% výkonu přístroje. Buněčný homogenát byl zamražen v tekutém dusíku a následně uložen do  $-78^{\circ}\text{C}$  pro další zpracování.

## 4.2 Určení koncentrace proteinů

Tab. 3: Roztoky použité pro určení koncentrace proteinů

<b>Činidlo A</b>	8 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,6 g vínanu sodného doplněno $\text{dH}_2\text{O}$ do 100 ml; pH 11,25
<b>Činidlo B</b>	3 g BCA (bicinchoninová kyselina); doplněno $\text{dH}_2\text{O}$ do 100 ml
<b>Činidlo C</b>	0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; doplněno $\text{dH}_2\text{O}$ do 10 ml

Koncentrace proteinů v experimentálních vzorcích byla stanovena BCA metodou, jako standard byl použit sérový hovězí albumin (BSA, Sigma-Aldrich). Kalibrační křivka BSA byla připravena podle rozpisu (Tab. 4) v 96-jamkové destičce. Experimentální vzorky byly naředěny 100x destilovanou vodou a napipetovány v triplikátech po 100  $\mu\text{l}$  na destičku. Následně bylo přidáno ke vzorkům a standardům 100  $\mu\text{l}$  reakční směsi (A : B : C = 25 : 26 : 1) (Tab. 3). Vzorky byly inkubovány 30 minut při 60°C na termobločku. Absorbance standardů a experimentálních vzorků byla změřena při 562 nm spektrofotometrem (Synergy HT, Biotek). Koncentrace proteinů ve vzorcích byla určena pomocí kalibrační křivky BSA v programu Gen 5.

Tab. 4: Pipetovací schéma kalibrační křivky BSA

Standard	BL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Obsah BSA [<math>\mu\text{g}</math>]</b>	0	0,2	0,5	1	1,5	2,5	4	6	10	15	20	30	50
<b>BSA (0,1<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>) [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	-
<b>BSA (1 <math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>) [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50
<b><math>\text{H}_2\text{O}</math> [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	100	98	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70	50

Zkratky: BL - blank; BSA – hovězí sérový albumin

### 4.3 SDS-PAGE elektroforéza

#### 4.3.1 Elektroforetická separace proteinů

Nejdříve byly připraveny experimentální vzorky pro SDS-PAGE elektroforézu. Vzorky byly pomocí Laemmliho vzorkového pufru (Tab. 5) a dH<sub>2</sub>O naředěny na konečnou koncentraci 1 µg/µl, přičemž Laemmliho vzorkový pufr tvořil 1/4 objemu vzorku. Vzorky byly následně povařeny 2 minuty při 100 °C, aby došlo k denaturaci proteinů. Připravené vzorky byly uchovány při -20°C.

Tab. 5: Roztoky použité pro elektroforetickou separaci vzorku

Laemmliho vzorkový pufr	2,4 ml 1 M Tris-HCl; pH 6,8
4x koncentrovaný	1 ml glycerolu 0,8 g SDS (dodecylsírán sodný) 0,8 g DTT (dithiothreitol) 1 mg bromfenolové modři doplněno dH <sub>2</sub> O do 10 ml
10% dělicí gel	4 ml H <sub>2</sub> O 2,5 ml pufr 1; pH 8,8 3,35 ml 30% akrylamid-0,8% N,N'-metylen bisakrylamid 100 µl 10% SDS (dodecylsírán sodný) 4 µl TEMED (tetrametyletylendiamin) 45 µl 10% APS (peroxodisírán amonný)
4% zaostřovací gel	3 ml H <sub>2</sub> O 1,25 ml pufr 2; pH 6,8 0,65 ml 30% akrylamid-0,8% N,N'-metylen bisakrylamid 50 µl 10% SDS 4 µl TEMED 45 µl 10% APS
Pufr 1	18,17 g Tris-HCl, doplněno dH <sub>2</sub> O do 100 ml, pH 8,8

Pufr 2	6,05 g Tris-HCl, doplněno dH <sub>2</sub> O do 100 ml, pH 6,8
Elektroforetický pufr	30,3 g Tris-HCl
10x koncentrovaný	141,1 g glycinu
	10 g SDS, doplněno dH <sub>2</sub> O do 1000 ml

Pro separaci proteinů byl připraven 10% dělicí gel (Tab. 5), který byl nalit do připravené elektroforetické aparatury. Gel byl převrstven roztokem butanolu a vody v poměru 3:1. Polymerace gelu probíhala 30-45 minut. Následně byl butanol vymyt dH<sub>2</sub>O a dělicí gel byl převrstven 4% zaostřovacím gelem se vsunutým hřebínkem a opět ponechán polymerovat přibližně 15 minut. Do vytvořených jamek byly nanесeny vzorky v množství od 10 µl do 20 µl a standard molekulových vah v množství 3 µl. Poté byla aparatura umístěna do elektroforetického pufru. Elektroforetická separace proteinů probíhala při konstantním napětí 200 V přibližně 50 minut.

### 4.3.2 Western blot

Tab. 6: Roztoky použité pro Western blot

Blotovací pufr	15 g Tris 72 g glycinu 1 l metanolu doplněno dH <sub>2</sub> O do 5l
TBS pufr	84,15 g NaCl
10x koncentrovaný	11,63 g Tris doplněno dH <sub>2</sub> O na 960 ml, pH 8
Blokovací pufr	2,5 g sušeného BSA 50 ml TBS pufru 50 µl Tween
Ředící pufr	0,5 g sušeného BSA 50 ml TBS pufru 50 µl Tween
Promývací pufr	100 ml TBS pufru 900 ml H <sub>2</sub> O 3 ml Tweenu 20

Po ukončení elektroforetické separace byl zaostřovací gel odstraněn. Dělicí gel se vzorky byl umístěn na nitrocelulózovou membránu (Amerham) a byla sestavena blotovací aparatura. Přenos proteinů probíhal 60 minut při konstantním napětí 100 V v blotovacím pufru (Tab. 6). Celkové množství přenesených proteinů na membránu bylo detekováno pomocí barvení Ponceau S. Výsledek barvení byl digitalizován a použit pro analýzu dat. Membrány byly následně blokovány v blokovacím pufru s 5% BSA po dobu 30 minut (Tab. 6). Poté byly vloženy do ředícího pufru s 3% BSA a příslušnými primárními protilátkami na 1 noc (Tab. 7).



Tab. 7: Seznam použitých primárních a sekundárních protilátek a jejich ředění

<b>Primární protilátka</b>	<b>Katalogové číslo</b>	<b>Ředění</b>	<b>Sekundární protilátka</b>	<b>Ředění</b>
<b>CREB</b>	sc-271	500x	Anti-M	20 000x
<b>p-CREB</b>	sc-81486	8 000x	Anti-M	20 000x
<b>ERK1/2</b>	137F5*	10 000x	Anti-R	40 000x
<b>p-ERK1/2</b>	197G2*	1 000x	Anti-R	40 000x
<b>MOR1</b>	sc-515933	1 000 x	Anti-R	40 000x
<b>Nestin</b>	sc-23927	1 000x	Anti-R	40 000x
<b>NSE</b>	PA1-46203 <sup>#</sup>	20 000x	Anti-M	20 000x
<b>NF-κB</b>	sc-514451	8 000x	Anti-M	20 000x
<b>p-NF-κB</b>	sc-135769	2 000x	Anti-M	20 000x
<b>p38</b>	sc-535	10 000x	Anti-M	20 000x
<b>p-p38</b>	sc-17852	2 000x	Anti-M	20 000x
<b>Synaptophysin</b>	MA5-14532 <sup>#</sup>	15 000x	Anti-R	40 000x
<b>TLR4</b>	sc-293072	1 000x	Anti-R	40 000x
<b>TH</b>	sc-14007	7 000x	Anti-M	20 000x

Zkratky: CREB - protein vázající cAMP-responzivní element; sc – Santa Cruz Technology; \* - Cell Signaling; # - Invitrogene; Anti-R – sekundární protilátky proti králičím proteinům (anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase-linked (GE Healthcare UK)); Anti-M – sekundární protilátky proti myším proteinům (anti-mouse IgG Horseradish Peroxidase-linked (GE Healthcare UK))

Druhý den byla membrána krátce opláchnuta dH<sub>2</sub>O a promyta třikrát po 10 minutách promývacím pufrém. Následně byla vložena do ředícího pufru se sekundárními protilátkami (Tab. 7) na 1 hodinu. Poté byla membrána opět opláchnuta dH<sub>2</sub>O a 3x po 10 minutách promyta v promývacím pufru. Po promytí oplachovacím pufrém byla membrána inkubována 1 minutu se substrátovým roztokem pro křenovou peroxidázu (SuperSignal West Dura, ThermoFisher Scientific). Nakonec byla membrána exponována na film (Agfa) a film byl vyvolán pomocí vyvolávacího přístroje (Optimax).

Filmy byly následně digitalizovány. Optická denzita signálu sledovaných proteinů byla měřena programem ImageJ. Optická denzita byla normalizována na celkové množství proteinů, které bylo vyhodnoceno pomocí barvení Ponceau S. Výsledky byly přepočítány na % kontroly, přičemž kontrola byly neovlivněné buňky. Uvedené výsledky byly získány minimálně ze tří nezávislých měření. Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu GraphPad Prism 7.0.

K určení statistické významnosti byla využita jednocestná ANOVA a následný post hoc Tukey test, nebo Studentův t-test. Statistická významnost byla určena na hladině  $p < 0,05$ .

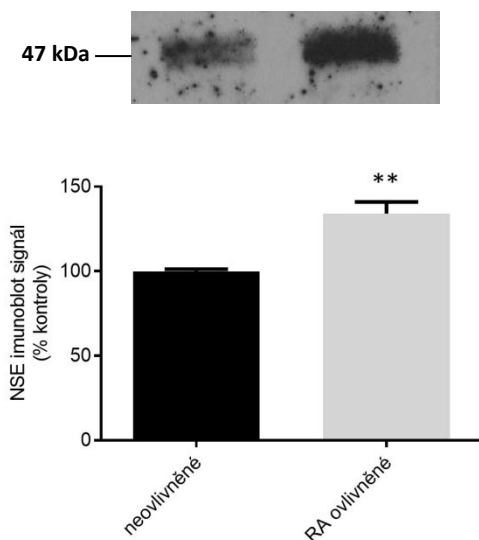
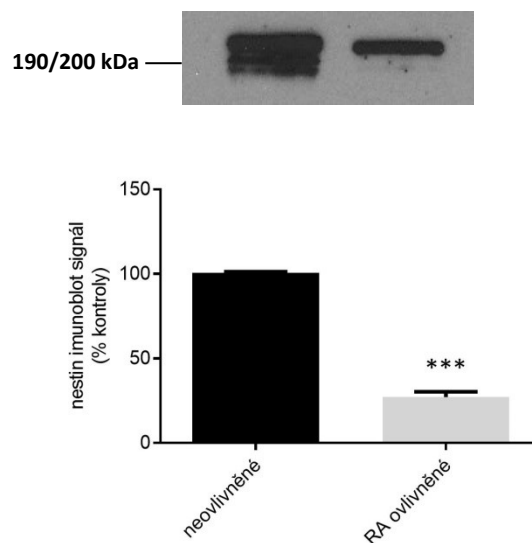
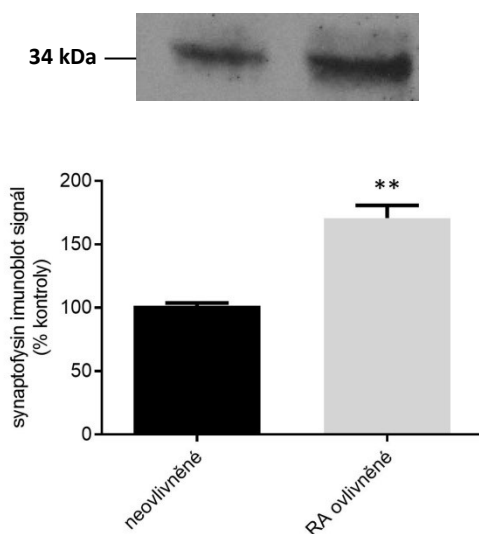
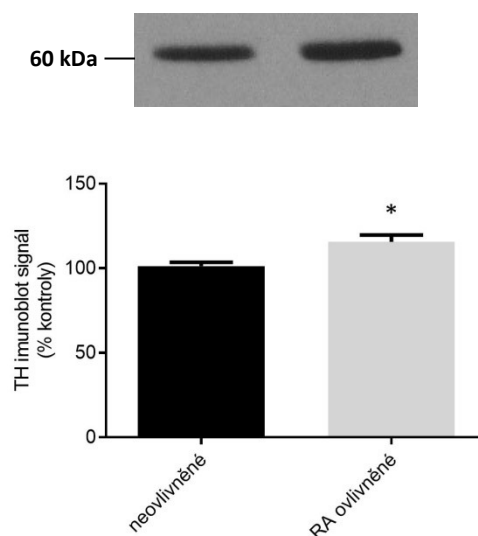
## 5 Výsledky

### 5.1 Ověření diferenciaci SH-SY5Y buněk

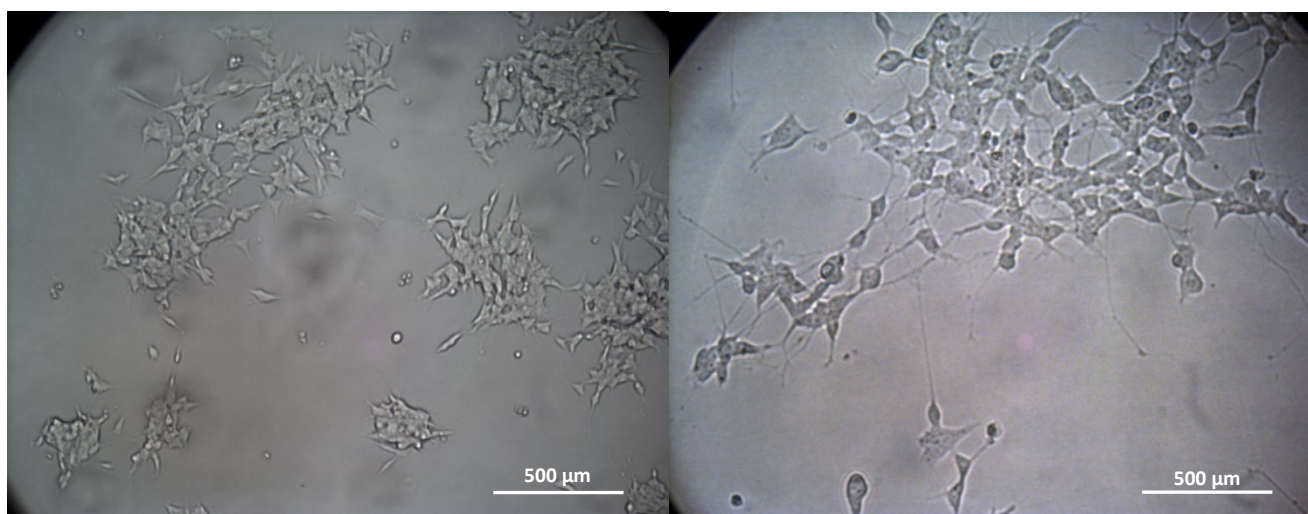
Diferenciace buněk buněčné linie SH-SY5Y vlivem RA byla ověřena srovnáním exprese markerů diferenciaci metodou SDS-PAGE elektroforézy. Analyzovány byly dvě skupiny vzorků. Za prvé to byly buňky nediferencované, které nebyly ovlivněny RA a za druhé buňky diferencované – ovlivněny RA v koncentraci 10  $\mu$ M po dobu 6 dní. Byly použity 3 markery plně maturovaných nervových buněk - NSE, synaptofysin, TH a 1 marker nediferencovaných (rané fáze) neuronů - nestin.

Všechny tři markery diferencovaných buněk byly signifikantně zvýšeny po ovlivnění buněk RA. Exprese NSE byla zvýšena o 34 % vůči kontrole ( $p < 0,01$ ), exprese synaptofysinu byla zvýšena o 69 % ( $p < 0,01$ ), exprese TH byla zvýšena o 14 % ( $p < 0,05$ ) (Graf 1). Naopak marker nediferencovaných buněk – nestin byl ve vzorcích připravených z buněk ovlivněných RA signifikantně snížen o 73 % ( $p < 0,001$ ) (Graf 1).

Diferencované SH-SY5Y buňky se liší od nediferencovaných i fenotypově. Z obr. 8 je patrné, že diferencované buňky mají dlouhé větvičky se výběžky a nemají tendenci růst ve shlucích na rozdíl od nediferencovaných buněk této linie.

**A****B****C****D**

**Graf 1:** Reprezentativní imunoblotty a grafy exprese markerů diferenciace u buněk – ovlivněných RA a neovlivněných RA (kontrola). (A) exprese NSE, (B) exprese nestinu, (C) exprese synaptofysinu, (D) exprese TH. Pořadí vzorků imunoblotty odpovídá pořadí vzorků grafu. Procenta na osách y udávají relativní úroveň exprese markerů u vzorků buněk ovlivněných RA oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr  $\pm$  SEM z 3-4 pokusů. \* signifikantní změna vůči kontrole ( $p < 0,05$ ); \*\* signifikantní změna vůči kontrole ( $p < 0,01$ ); \*\*\* signifikantní změna vůči kontrole ( $p < 0,001$ ).



*Obr. 8:* Reprezentativní snímky ze světelného mikroskopu srovnávající fenotyp buněk neovlivněných RA (vlevo) a ovlivněných buněk RA (vpravo). Měřítka – 500  $\mu\text{m}$ .

## 5.2 Vliv morfinu na viabilitu buněk po působení oxidativního stresu

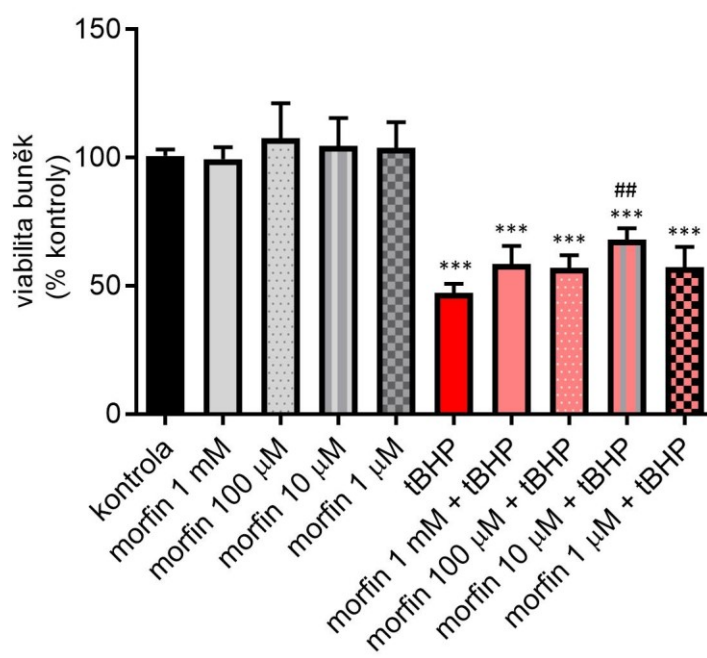
S využitím MTT testu bylo studováno, zda 24 hodinové působení morfinu v koncentracích 1 mM, 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$  má vliv na přežití diferencovaných buněk SH-SY5Y linie po působení oxidativního stresu vyvolaného tBHP v koncentraci 500  $\mu\text{M}$  na 2 hodiny.

Viabilita byla měřena u těchto experimentálních skupin diferencovaných buněk:

- neovlivněných žádnou látkou, tzv. kontrolní
- ovlivněných morfinem ve vybraných koncentracích
- ovlivněných tBHP
- ovlivněných morfinem ve vybraných koncentracích a následně tBHP

Ovlivnění buněk morfinem v koncentracích od 1 mM po 1  $\mu\text{M}$  na 24 hodin nemělo signifikantní vliv na změnu buněčné viability v porovnání s kontrolou. Oxidativní stres vyvolaný působením tBHP vedl k statisticky významnému snížení viability v porovnání s kontrolou jak u buněk neovlivněných morfinem (snížení viability o 54 %), tak i u všech použitých koncentrací morfinu ( $p < 0,001$ ). Viabilita byla snížena o 42 % v případě 1 mM morfinu, o 44 % v případě 100  $\mu\text{M}$  morfinu, o 33 % v případě 10  $\mu\text{M}$  morfinu, o 43 % v případě 1  $\mu\text{M}$  morfinu.

Statistické vyhodnocení srovnání vlivu jednotlivých koncentrací morfinu na přežití buněk po působení tBHP ukázalo, že buňky ovlivněné 10  $\mu$ M morfinem na 24 hodin signifikantně zvýšily svojí viabilitu v porovnání s buňkami ovlivněnými pouze tBHP (zvýšení o 21 %) ( $p < 0,01$ ). Buňky ovlivněné ostatními koncentracemi morfinu nesignifikantně zvýšily viabilitu v reakci na působení tBHP v porovnání s viabilitou buněk ovlivněných pouze tBHP. 1 mM morfin zvýšil viabilitu buněk o 11 %, 100  $\mu$ M morfin zvýšil viabilitu buněk o 10 %, 1  $\mu$ M morfin zvýšil viabilitu buněk o 10 % (Graf 2).



*Graf 2:* Vliv morfinu na viabilitu buněk po působení oxidativního stresu. Procenta na ose y udávají relativní změnu buněčné viability u ovlivněných buněk oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr  $\pm$  SEM z 8 nezávislých měření vykonaných v pentaplikátech. \*\*\* signifikantní změna vůči kontrole ( $p < 0,001$ ), ## signifikantní změna vůči tBHP ( $p < 0,01$ ).

### 5.3 Role MOR a TLR4 v protektivním působení morfinu

Účast MOR a TLR4 v protektivním účinku morfinu proti navozenému oxidativnímu stresu tBHP byla studována pomocí dvou receptorových antagonistů a RNA interference. Jedním z antagonistů byl naloxon, který je kompetitivním antagonistou jak MOR, tak i TLR4. Druhý použitý antagonist TAK-242 působí pouze na signalizaci TLR4, kdy blokuje spojení receptoru s jeho adaptorovými molekulami.

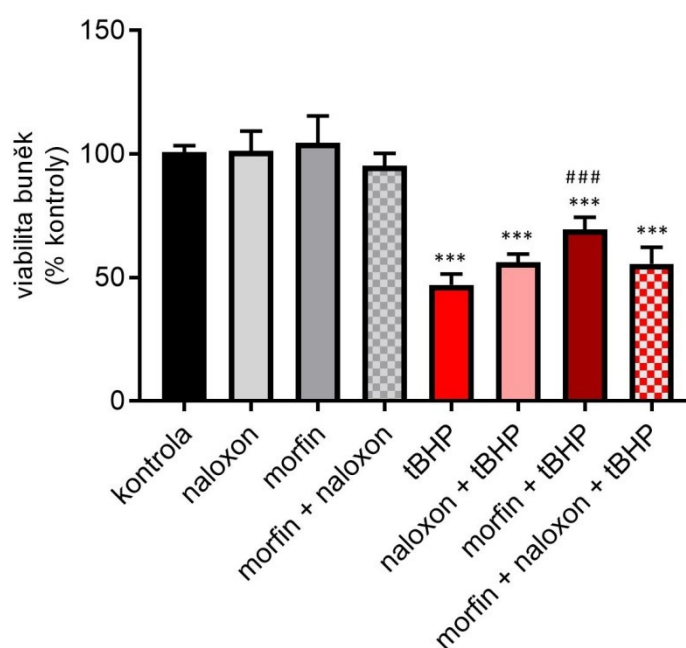
Metodou RNA interference s použitím siRNA proti MOR byla sledována účast MOR na protektivním účinku morfinu. Pro všechny následující experimenty byla vybrána koncentrace morfinu 10  $\mu$ M, jelikož v této koncentraci bylo dosaženo signifikantního protektivního účinku (kap. 5.2.). Buňky byly dále ovlivněny TAK-242 a naloxonem v koncentracích 10  $\mu$ M na 24 hodin. tBHP působil v koncentraci 500  $\mu$ M po dobu 2 hodin.

Vliv naloxonu na viabilitu buněk byl sledován u následujících experimentálních skupin:

- buňky neovlivněné (kontrola)
- buňky ovlivněné naloxonem
- buňky ovlivněné morfinem
- buňky ovlivněné morfinem + naloxonem
- buňky ovlivněné tBHP
- buňky ovlivněné naloxonem + tBHP
- buňky ovlivněné morfinem + tBHP
- buňky ovlivněné morfinem + naloxonem + tBHP

Nebyla prokázána signifikantní změna ve viabilitě buněk u vzorků ovlivněných naloxonem, morfinem a morfinem + naloxonem v porovnání s buňkami neovlivněnými, tzv. kontrolními. Statisticky významný pokles viability byl prokázán u buněk vystavených působení tBHP ( $p < 0,001$ ). Viabilita byla v tomto případě snížena o 54 % oproti kontrole. K statisticky prokazatelnému snížení životaschopnosti v porovnání s kontrolou došlo i u všech ostatních skupin ovlivněných buněk po působení tBHP ( $p < 0,001$ ). V případě buněk vystavených působení naloxonu + tBHP byla viabilita snížena ve srovnání s kontrolou o 45 %. Morfin + tBHP snížil viabilitu o 31 %. Morfin + naloxon + tBHP prokazatelně snížil viabilitu o 45 %.

Vzájemné statistické srovnání skupin buněk ovlivněných tBHP neprokázalo žádnou statisticky významnou změnu, kromě skupiny ovlivněné morfinem + tBHP. U této skupiny buněk došlo k signifikantnímu zvýšení viability oproti buňkám ovlivněným pouze tBHP ( $p < 0,001$ ). Rozdíl ve viabilitě těchto dvou skupin činil 22 % (Graf 3).



*Graf 3:* Vliv zablokování MOR a TLR4 naloxonem na protektivní účinky morfinu. Procenta na ose y udávají relativní změnu buněčné viability u ovlivněných buněk oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr  $\pm$  SEM z 8 nezávislých měření vykonaných v pentaplikátech. \*\*\* signifikantní změna vůči kontrole ( $p < 0,001$ ), ### signifikantní změna vůči tBHP ( $p < 0,001$ ).

Vliv zablokování TLR4 pomocí TAK-242 na viabilitu buněk byl měřen u 6 experimentálních skupin:

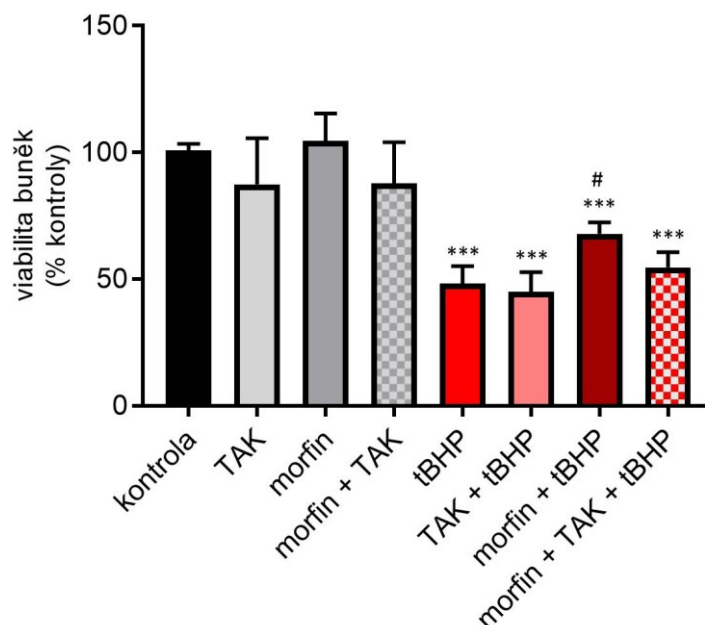
- buňky neovlivněné (kontrola)
- buňky ovlivněné TAK-242
- buňky ovlivněné morfinem
- buňky ovlivněné morfinem + TAK-242
- buňky ovlivněné tBHP
- buňky ovlivněné TAK-242 + tBHP



- buňky ovlivněné morfinem + tBHP
- buňky ovlivněné morfinem + TAK-242 + tBHP

U buněk ovlivněných TAK-242, morfinem a morfinem + TAK-242 nebyla prokázána signifikantní změna v životnosti buněk v porovnání s kontrolní skupinou buněk. Buňky ovlivněné tBHP signifikantně snížily svoji viabilitu v porovnání s kontrolou ( $p < 0,001$ ). Viabilita byla snížena oproti kontrole o 53 %. Statisticky snížená viabilita byla detekována také u buněk ovlivněných TAK-242 + tBHP, morfinem + tBHP a morfinem + TAK-242 + tBHP oproti kontrole ( $p < 0,001$ ). V případě působení TAK-242 a tBHP byla viabilita snížena oproti kontrole o 56 %. Ovlivnění morfinem + tBHP došlo k poklesu životnosti o 33 %. Ovlivnění morfinem + TAK-242 + tBHP vedlo ke snížení viability o 46 %.

Ovlivnění buněk TAK-242 + tBHP a ovlivnění morfinem + TAK-242 + tBHP nevedlo ke statisticky významné změně buněčné viability v porovnání s buňkami ovlivněným tBHP. Pouze skupina buněk ovlivněná morfinem + tBHP signifikantně zvýšila svoji viabilitu vůči buňkám inkubovaným s tBHP ( $p < 0,05$ ). Nárůst ve viabilitě činil 20 % (Graf 4).



*Graf 4:* Vliv zablokování TLR4 TAK-242 na protektivní účinky morfinu. Procenta na ose y udávají relativní změnu buněčné viability u ovlivněných buněk oproti kontrole.

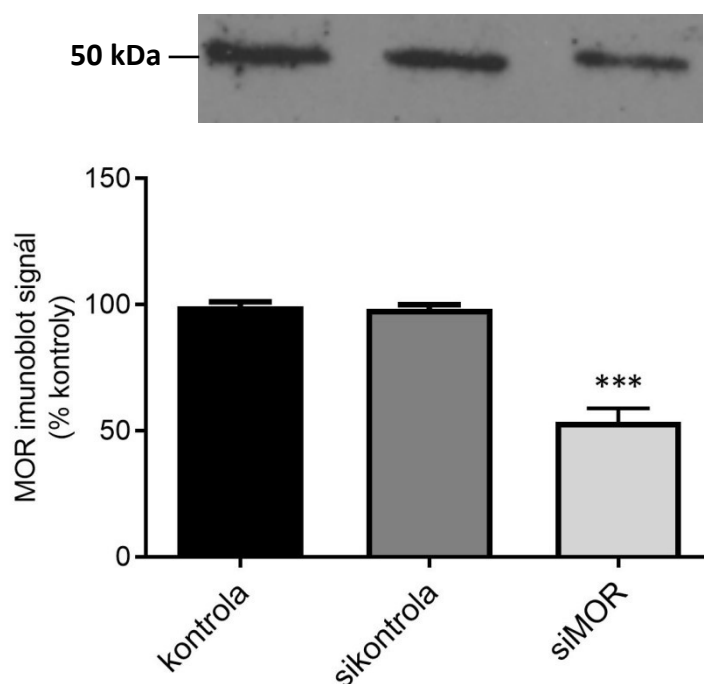
Výsledky reprezentují průměrné hodnoty  $\pm$  SEM z 8 nezávislých měření vykonaných v pentaplikátech. \*\*\* signifikantní změna vůči kontrole ( $p < 0,001$ ), # signifikantní změna vůči tBHP ( $p < 0,05$ ).

Pomocí metody RNA interference a následného MTT testu bylo zkoumáno, zda se protektivní účinek morfinu manifestuje přes MOR a/nebo TLR4. Jelikož naloxon je nespecifický antagonist MOR, ale i TLR4, byla použita k specifickému zablokování MOR siRNA proti MOR. Ověření účinnosti RNA interference na zablokování exprese MOR byla sledována metodou SDS-PAGE elektroforézy. Změny v expresi MOR byly analyzovány u těchto vzorků diferencovaných buněk:

- neovlivněných žádnou látkou (kontrola)
- ovlivněných kontrolní siRNA (sikontrola)
- ovlivněných siRNA proti MOR (siMOR)

Expres MOR byla porovnána s kontrolní siRNA (sikontrola). Výsledky prokázaly signifikantní snížení exprese MOR pomocí RNA interference. Sikontrola a kontrola se mezi sebou nelišily v expresi MOR.

Expres MOR u vzorků s použitou siRNA proti MOR byla snížena o 45 % oproti sikontrolě ( $p < 0,001$ ). Ostatní vzorky ovlivněných buněk nevykazovaly signifikantní změny v expresi MOR (Graf 5).



*Graf 5:* Reprezentativní imunoblot a graf exprese MOR. Pořadí vzorků imunoblodu odpovídá pořadí vzorků grafu. Procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese MOR u ovlivněných buněk oproti sikontrolě. Výsledky reprezentují průměr  $\pm$  SEM z 3 pokusů. \*\*\* signifikantní změna vůči sikontrolě ( $p < 0,001$ ).

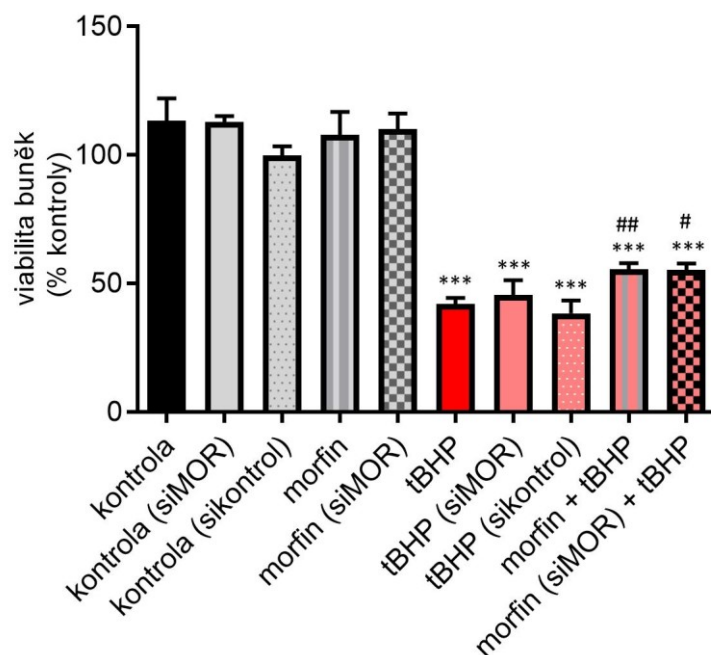
### **Vliv snížení exprese MOR pomocí RNA interference na protektivní účinky morfinu**

Buňky byly po diferenciaci vystaveny siRNA proti MOR a následně ovlivněny morfinem a tBHP podle schématu obr. 6 (kap. 4.1.4). Změny ve viabilitě buněk po zablokování MOR příslušnou siRNA byly sledovány u následujících skupin buněk:

- buňky neovlivněné (kontrola)
- buňky ovlivněné siRNA proti MOR (siMOR)
- buňky ovlivněné kontrolní siRNA (sikontrol)
- buňky ovlivněné morfinem
- buňky ovlivněné siRNA proti MOR (siMOR) a následně morfinem
- buňky ovlivněné tBHP
- buňky ovlivněné siRNA proti MOR (siMOR) a následně tBHP
- buňky ovlivněné siRNA (sikontrol) a následně tBHP
- buňky ovlivněné morfinem a následně tBHP
- buňky ovlivněné siRNA proti MOR (siMOR) a následně morfinem a tBHP

Vyhodnocením MTT testů bylo zjištěno, že nedošlo k signifikantní změně ve viabilitě buněk neovlivněných (kontrola), buněk ovlivněných siRNA proti MOR (kontrola (siMOR)), buněk ovlivněných morfinem ani buněk, které měly zablokované MOR (siMOR) a byly následně vystaveny morfinu (morfin (siMOR)), vůči buňkám ovlivněným kontrolní siRNA (kontrola (sikontrol)). K signifikantnímu snížení buněčné životnosti došlo však u buněk, na které působil samotný tBHP (snížení o 58 %) dále u buněk se zablokovaným MOR a zároveň pod vlivem tBHP (tBHP (siMOR)) (snížení o 54 %) i u buněk vystavených kontrolní siRNA a tBHP (tBHP (sikontrol)) (snížení o 61 %) vůči kontrole (sikontrol) ( $p < 0,001$ ). Dále byla statisticky snížená viabilita sledována u buněk ovlivněných morfinem + tBHP (snížení o 44 %) a u buněk se zablokovaným MOR a ovlivněných morfinem + tBHP vůči kontrole (sikontrol) (snížení o 45 %) ( $p < 0,001$ ) (Graf 6).

Signifikantně zvýšená viabilita byla pozorována u buněk ovlivněných morfinem + tBHP, ale i u buněk, které měly zablokovaný MOR (siMOR) a byly posléze ovlivněny morfinem + tBHP vzhledem k buňkám ovlivněným kontrolní siRNA a následně tBHP (tBHP (sikontrol)). V případě morfinu + tBHP byla viabilita zvýšena o 17 % ( $p < 0,01$ ). V případě buněk se zablokovaným MOR a ovlivněných morfinem + tBHP došlo ke zvýšení viability o 16 % ( $p < 0,05$ ) (Graf 6).



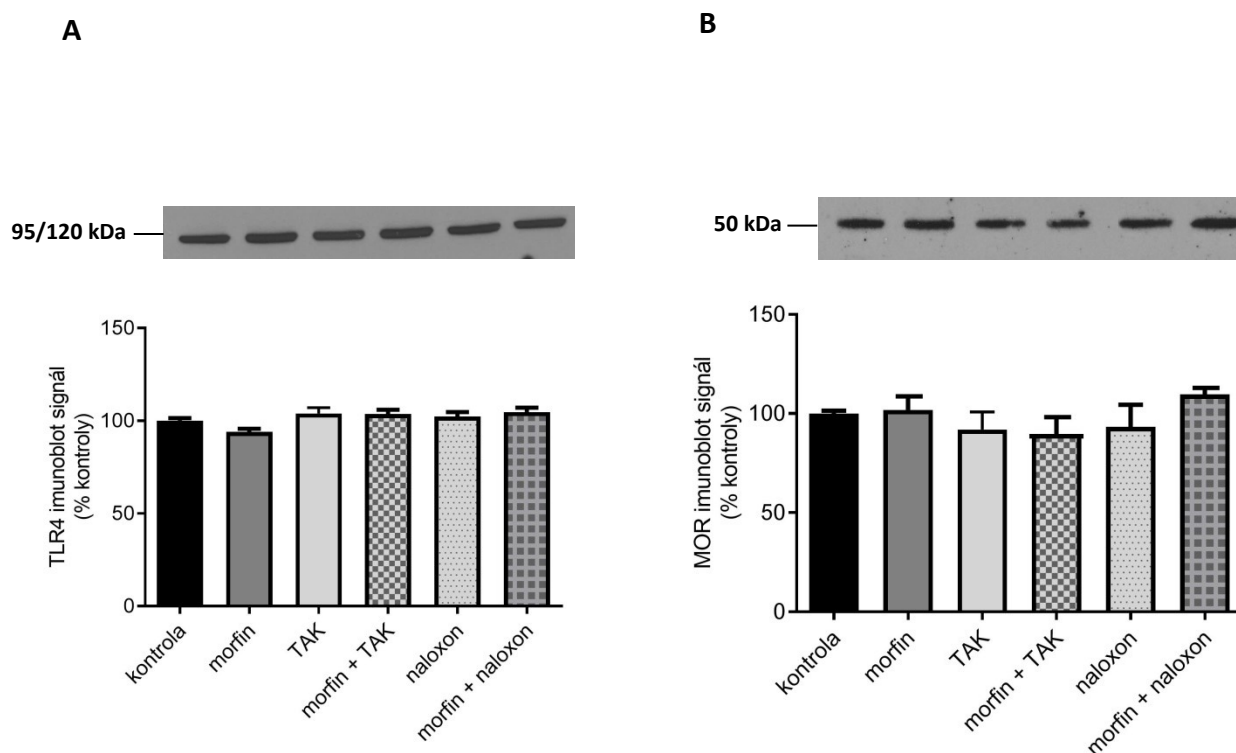
*Graf 6:* Vyhodnocení vlivu zablokování MOR metodou RNA interference na buněčnou viabilitu testovaných skupin buněk. Procenta na ose y udávají relativní změnu buněčné viability u ovlivněných buněk oproti kontrole (kontrola (sikontrol)). Výsledky reprezentují průměr  $\pm$  SEM ze 4 nezávislých měření vykonaných v pentaplikátech. \*\*\* signifikantní změna vůči kontrole (sikontrol) ( $p < 0,001$ ), # signifikantní změna vůči tBHP (sikontrol) ( $p < 0,05$ ), ## signifikantní změna vůči tBHP (sikontrol) ( $p < 0,01$ ).

#### 5.4 Vliv chronického morfinu na MOR, TLR4 a signální dráhu MAPK

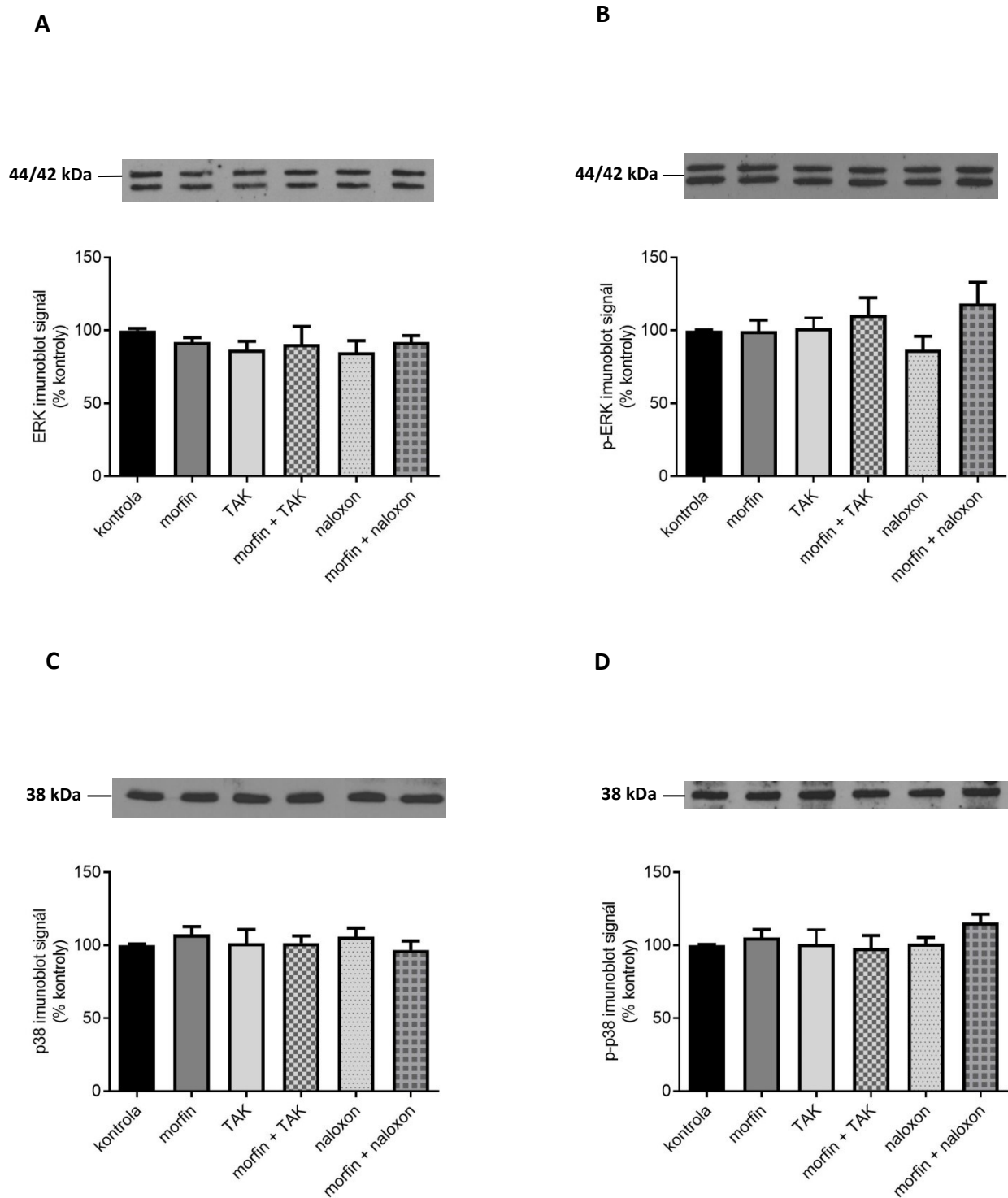
Změny v expresi MOR, TLR4 a zvolených členů MAPK signální kaskády vlivem chronického působení morfinu v protektivní 10  $\mu$ M koncentraci byly studovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy u diferencovaných SH-SY5Y buněk. Buňky byly po diferenciaci ovlivněny 10  $\mu$ M morfinem, 10  $\mu$ M TAK-242, 10  $\mu$ M naloxonem a jejich vzájemnými kombinacemi na 24 hodin podle schématu obr. 5 (kap. 4.1.4). Změny byly analyzovány v 6 skupinách experimentálních vzorků:

- neovlivněné buňky, tzv. kontrolní
- buňky ovlivněné morfinem
- buňky ovlivněné TAK-242
- buňky ovlivněné morfinem + TAK-242
- buňky ovlivněné naloxonem
- buňky ovlivněné morfinem + naloxonem

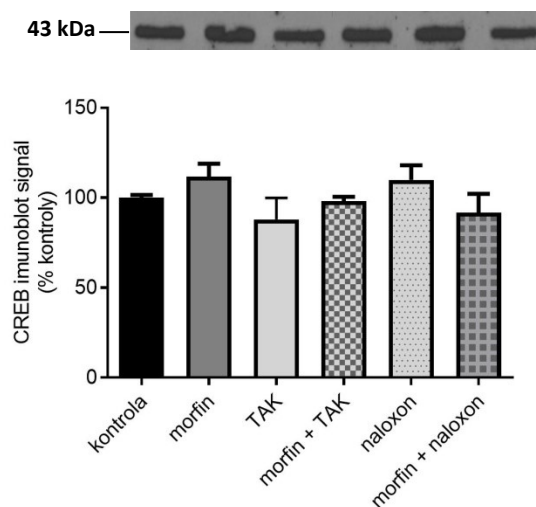
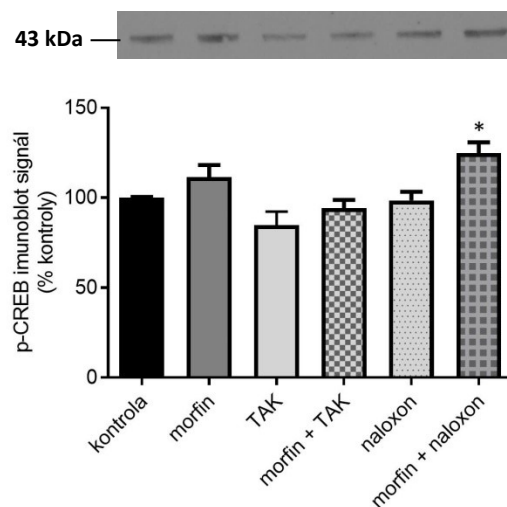
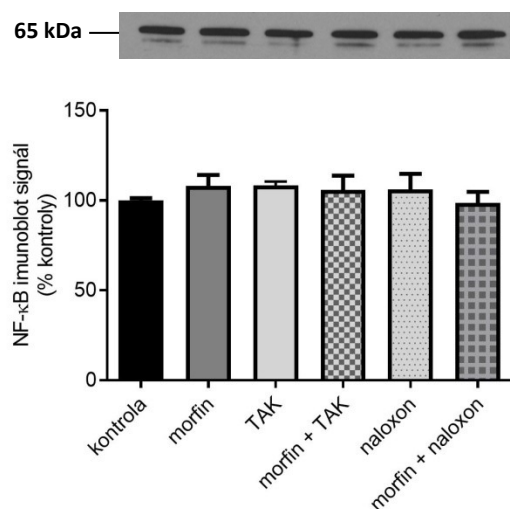
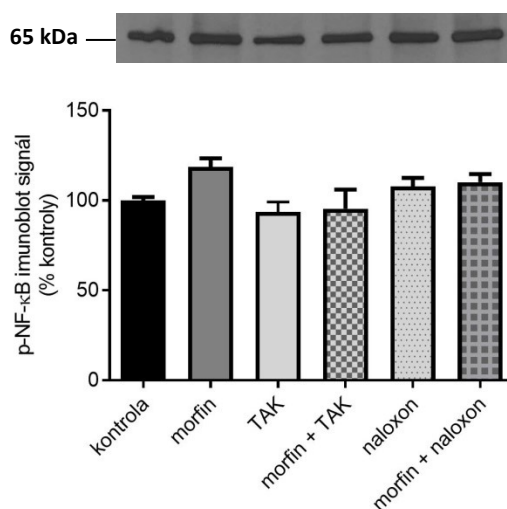
Bylo prokázáno signifikantní zvýšení exprese p-CREB u vzorků ovlivněných morfinem + naloxonem oproti kontrole ( $p < 0,05$ ). Expres byla zvýšena o 26% (Graf 9). U ostatních analyzovaných proteinů nebyly naměřeny signifikantní rozdíly mezi sledovanými skupinami (Graf 7-9).



*Graf 7:* Reprezentativní imunoblotty a graf míry exprese TLR4 a MOR u jednotlivých skupin buněk. (A) exprese TLR4, (B) exprese MOR. Pořadí vzorků imunoblotu odpovídá pořadí vzorků grafu. Procenta na osách y udávají relativní úroveň exprese TLR4 a MOR u ovlivněných buněk oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr  $\pm$  SEM z 5 pokusů.



*Graf 8:* Reprezentativní imunoblotty a graf míry exprese testovaných proteinů u jednotlivých skupin buněk. (A) exprese ERK1/2, (B) exprese p-ERK1/2, (C) exprese p38, (D) exprese p-p38. Pořadí vzorků imunoblotu odpovídá pořadí vzorků grafu. Procenta na osách y udávají relativní úroveň exprese u vybraných proteinů ovlivněných buněk oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr  $\pm$  SEM z 5 pokusů.

**A****B****C****D**

**Graf 9:** Reprezentativní imunoblotty a graf míry exprese testovaných proteinů u jednotlivých skupin buněk. (A) exprese CREB, (B) exprese p-CREB, (C) exprese NF-κB, (D) exprese p-NF-κB. Pořadí vzorků imunoblotty odpovídá pořadí vzorků grafu. Procenta na osách y udávají relativní úroveň exprese u vybraných proteinů ovlivněných buněk oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr ± SEM z 5 pokusů. \* signifikantní změna vůči kontrole ( $p < 0,05$ ).



### Vyhodnocení poměru exprese fosforylovaných a nefosforylovaných forem MAPK

Byla porovnána exprese fosforylovaných forem proteinů vůči nefosforylovaným formám proteinů a srovnána s kontrolou u členů signální kaskády MAPK. Bylo zjištěno signifikantní zvýšení poměru exprese p-CREB/CREB u buněčných vzorků ovlivněných morfinem + naloxonem ( $p < 0,01$ ). Poměr exprese ostatních členů MAPK se signifikantně nezměnil u žádného z ovlivněných vzorků.

Tab. 8: Poměr exprese fosforylovaných a nefosforylovaných forem proteinů

	kontrola	morfin	TAK	morfin + TAK	naloxon	morfin + naloxon
pERK/ERK	1,0 ± 0,01	1,09 ± 0,07	1,08 ± 0,02	1,12 ± 0,09	1,06 ± 0,05	1,15 ± 0,08
p-p38/p38	1,0 ± 0,01	1,0 ± 0,07	1,0 ± 0,03	0,88 ± 0,04	0,93 ± 0,03	1,14 ± 0,06
p-CREB/CREB	1,0 ± 0,02	0,99 ± 0,11	1,0 ± 0,12	0,97 ± 0,04	0,92 ± 0,02	1,43 ± 0,17**
p-NF-κB/NF-κB	1,0 ± 0,02	1,04 ± 0,03	0,86 ± 0,05	0,97 ± 0,12	0,98 ± 0,07	1,07 ± 0,06

Hodnoty v tabulce udávají relativní úroveň exprese fosforylovaných a nefosforylovaných forem proteinů vyjádřených jako poměr oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr ± SEM z 5 pokusů. \*\* signifikantní rozdíl vůči kontrole ( $p < 0,01$ ).

## 6 Diskuze

SH-SY5Y je lidská neuroblastomová linie, která slouží jako model nervových buněk pouze v případě, že je diferencovaná do plně maturovaných nervových buněk. Většina odborných prací využívá k navození diferenciace SH-SY5Y buněk RA (Cheung et al., 2009; Kunzler et al., 2016; Tepola et al., 2015; Yu et al., 2003), a proto byl obdobný protokol diferenciace zvolen i pro naše experimenty. Diferencovaný stav buněk byl ověřen pomocí markerů plně maturovaných nervových buněk. Mezi tyto markery patří NSE, TH a synaptofysin. Dále byl detekován marker nediferencovaných (rané fáze) neuronů – nestin (Shipley et al., 2016). Metodou SDS-PAGE elektroforézy bylo prokázáno signifikantní zvýšení exprese všech markerů diferencovaných buněk u SH-SY5Y linie ovlivněné RA. Naopak nestin vykazoval signifikantně nižší expresi v porovnání s buňkami neovlivněnými RA. Uvedené výsledky jsou v souladu s pracemi popisujícími změny v expresi markerů diferenciace (Cheung et al., 2009). Diferencované buňky se liší od nediferencovaných i fenotypově. Diferencované SH-SY5Y buňky tvoří dlouhé větvičky se výběžky (neurity) a nemají tendenci růst ve shlucích na rozdíl od nediferencovaných buněk (Tepolla et al., 2015). I tento fenotypový rozdíl byl zřetelně pozorován v našem uspořádání diferenciace (Obr. 8).

Autoři dostupné literatury se značně liší v názoru, zda morfin působí protektivně (anti-oxidativně) nebo pro-oxidativně v reakci na oxidativní stres. Důvod těchto nejasností patrně tkví v rozdílných experimentálních podmínkách, jako je typ buněčné linie, koncentrace morfinu, doba jeho působení, ale i způsob vyvolání oxidativního stresu. Jedním z cílů této práce proto bylo určit, zda chronické působení morfinu (24 hodin) v koncentracích 1 mM, 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M a 1  $\mu$ M má protektivní nebo pro-oxidativní účinky proti oxidativnímu stresu vyvolanému stabilním analogem  $H_2O_2$  – tBHP u diferencovaných buněk SH-SY5Y. Již dříve bylo prokázáno, že tBHP zvyšuje oxidativní stres u SH-SY5Y buněk, a tím může vyvolat buněčnou smrt (Choi et al., 2011; Krishnamurthy et al., 2000). Působení 500  $\mu$ M tBHP na 2 hodiny v našich experimentech vedlo k 54 % snížení viability buněk měřené MTT testem. Chronické působení morfinu ve všech testovaných koncentracích mělo protektivní efekt proti působení oxidativního stresu tBHP, nicméně tento efekt výrazně závisel na koncentraci účinkujícího morfinu. Prokazatelně signifikantní protektivní účinek byl nalezen pouze v případě ovlivnění buněk 10  $\mu$ M morfinem. V této koncentraci byla zjištěna o 21% zvýšená viabilita buněk oproti neovlivněným buňkám po působení tBHP.

U ostatních koncentrací morfinu (1 mM, 100  $\mu$ M, 1  $\mu$ M) nebyl zaznamenán protektivní účinek na hladině statistické významnosti. Srovnání se studiemi, které se zabývaly také otázkou vlivu morfinu na oxidativní stres, je obtížná, protože žádná z dostupných prací nevyužívala zcela totožného experimentálního modelu. Nicméně většina odborných prací také popisovala podobné výsledky, kdy morfin měl v různých koncentracích až protichůdné účinky. Je otázkou, proč nejvyšší protektivní účinek vykazoval morfin v koncentraci 10  $\mu$ M. Pravděpodobným zdůvodněním je, že koncentrace nižší, tzn. 1  $\mu$ M, ještě nemusela být dostatečně vysoká k aktivaci ochranných mechanismů buňky před oxidativním stresem a naopak koncentrace vyšší, tj. 100  $\mu$ M a 1 mM mohly na buňky působit již také negativně. V těchto koncentracích mohlo docházet ke kombinaci protektivního a pro-oxidativního účinku morfinu. Existují studie, které ukázaly, že ovlivnění SH-SY5Y buněk ve značně vyšších koncentracích morfinu 0,5-4 mM na dobu 48 hodin vedlo k jejich apoptóze (Lin et al., 2007). Podobně působil na C6 buňky morfin i v koncentraci 3 mM (Zhou et al., 2011). Morfin vyvolal apoptózu také u kultur lidských primárních fetálních mikroglií a neuronálních buněk vystavených 10  $\mu$ M morfinu, přičemž neuronální buňky se ukázaly být mnohem citlivější k toxicitě vyvolané morfinem než mikroglie. Zmíněné buňky byly jednak ovlivněny morfinem po dobu 5 dní a za druhé se jednalo o primární kultury na rozdíl od buněčných linií, což mohly být důvody toxického působení morfinu v takto nízkých koncentracích a rozdílu oproti našim výsledkům (Hu et al., 2002).

K závěru, že 24 hodinové působení morfinu má protektivní účinek proti působení oxidativního stresu, došly i jiné studie, nicméně je nutné podotknout, že tyto studie využívaly jako model potkaní astrocyty a C6 gliomové buňky a oxidativní stres byl vyvolán glutamátem nebo donorem peroxynitritu, 3-morfolinosydnoniminem. Protektivní působení morfinu bylo u těchto prací prokázáno v rozmezí koncentrací od 50 do 200  $\mu$ M (Kim et al., 2001; Lee et al., 2004). Protektivní účinek morfinu u C6 gliomových buněk byl prokázán i u značně nižší koncentrace morfinu, a sice 1  $\mu$ M (Costa-Malaquias et al., 2014). Shodně s naší prací využívali k vyvolání oxidativního stresu tBHP i Škrabalová a kol. Tito autoři, zjistili, že morfin v koncentracích od 1  $\mu$ M po 1 mM vykazoval u H9c2 buněk protekci a že anti-oxidativní účinek se zvyšoval s rostoucí koncentrací morfinu (Škrabalová et al., 2018). Účinky morfinu jsou tradičně spojovány s MOR, nicméně některé studie ukázaly, že morfin může působit protektivně i ovlivněním signální kaskády TLR4 (Stevens et al., 2013). Dalším naším cílem bylo tudíž určit, zda morfin vykazuje potvrzené protektivní účinky aktivací signální kaskády MOR a/nebo TLR4 u SH-SY5Y buněk.

Účast MOR a/nebo TLR4 v protektivním účinku morfinu proti navozenému oxidativnímu stresu tBHP byla studována pomocí dvou receptorových antagonistů a RNA interference. Jedním z antagonistů byl naloxon, který je kompetitivním antagonistou jak MOR tak i TLR4, nicméně může působit i jako inverzní agonista za podmínek, kdy je podán až po morfinu (Wang et al., 2001). Druhý použitý antagonist TAK-242, jenž působí pouze na signalizaci TLR4, se váže k Cys747 TLR4 a blokuje interakci receptoru s jeho adaptorovými molekulami - TRAM a TIRAP (Matsunaga et al., 2011). Protektivní účinek chronického podání 10  $\mu$ M morfinu proti tBHP navozenému oxidativnímu stresu byl výrazně potlačen u buněk, které měly zablokované MOR a TLR4 10  $\mu$ M naloxonem. Protektivní účinek 10  $\mu$ M morfinu je tedy závislý na receptorech a nereceptorové účinky morfinu jakožto scavengeru se pravděpodobně neprojevují.

Zablokování TLR4 signalizace specifickým antagonistou TAK-242 v konc. 10  $\mu$ M vedlo k evidentnímu utlumení protektivního účinku morfinu po vyvolání oxidativního stresu tBHP. Z tohoto výsledku se dá usuzovat, že TLR4 se patrně více uplatňuje na protektivním účinku morfinu než samotné MOR.

Pro detailnější analýzu role MOR a TLR4 v morfinové protekci byl i MOR specificky zablokován použitím příslušné siRNA. Úspěšnost zablokování MOR pomocí siRNA byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Výsledky potvrdily, že siRNA proti MOR signifikantně snížila expresi MOR u SH-SY5Y buněk. Metoda RNA interference prokázala, že i přes snížení exprese MOR na povrchu buněk, morfin zvyšoval viabilitu buněk po působení tBHP. Tento výsledek podporuje předchozí pozorování, že za protektivní účinek 10  $\mu$ M morfinu u diferencovaných SH-SY5Y buněk je pravděpodobně odpovědná signalizace aktivovaná TLR4. Nutno dodat, že snížení exprese MOR bylo jen o polovinu. Nelze tedy zcela vyloučit ani efekt MOR na protekci 10  $\mu$ M morfinu. K dalšímu posouzení účasti MOR a TLR4 na protekci by bylo vhodné použít i siRNA proti TLR4.

Morfin aktivací MOR a TLR4 spouští kromě jejich klasických signálních drah i signální kaskádu MAPK (Bilecki et al., 2005; Lu et al., 2008). Mechanismus protektivního účinku morfinu není zatím zcela znám, ale předpokládá se právě účast MAPK dráhy (Cao et al., 2013; Ma et al., 2001; Škrabalová et al., 2018). Předmětem studia naší práce proto bylo, sledovat změny v expresi jednak obou buněčných receptorů, vybraných členů MAPK kaskády a jednak transkripčních faktorů u diferencovaných SH-SY5Y buněk ovlivněných 10  $\mu$ M morfinem, dále při zablokování MOR i TLR4 naloxonem, při zablokování TLR4 TAK-242 a také u buněk simultánně ovlivněných jednotlivými antagonisty a morfinem.

V rámci MAPK byla zkoumána pomocí SDS-PAGE elektroforézy exprese proteinů ERK1/2, p38 a jejich fosforylovaných forem. Dále byla sledována změna v expresi transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B a jeho fosforylované formy, který je typický pro signální dráhu TLR4 a změna exprese transkripčního faktoru CREB a jeho fosforylované formy, který je aktivován signální dráhou MOR. Žádná z výše uvedených látek, kterými byly diferencované SH-SY5Y buňky ovlivněny nevyvolala signifikantní změnu v expresi MOR ani TLR4. Nicméně bylo prokázáno několika studiemi na SH-SY5Y buňkách, že na úrovni exprese mRNA morfin v koncentraci 10  $\mu$ M signifikantně snižoval expresi mRNA pro MOR a toto snížení bylo zrušeno předchozím ovlivněním buněk naloxonem (Caputi et al., 2013; Prenus et al., 2012; Saify and Saadat, 2016).

Výsledky našich experimentů ukázaly, že se nemění exprese ani u proteinů ERK1/2 a p-38 a jejich fosforylovaných forem u diferencovaných SH-SY5Y buněk ovlivněných výše zmíněnými látkami. Nezměnily se signifikantně ani poměry exprese p-ERK/ERK a p-p38/p38 u takto ovlivněných buněk. Výsledky některých studií ukázaly, že chronické působení morfinu ve stejné koncentraci, jaká byla použita v našich experimentech, signifikantně zvýšilo množství p-p38. Působení naloxonu pak aktivaci p-p38 snížilo. Tyto studie sice používaly buněčné experimentální modely, ale jednalo se o primární kultury buněk ze spinálních ganglií dorzálních kořenů a izolované potkaní kortikální neurony (Cao et al., 2013; Ma et al., 2001). Ostatní studie, které se také zaměřovaly na roli ERK1/2 použily model SH-SY5Y buněk, které ale nebyly diferencované, což může být jedním z důvodů, proč tyto práce přinášejí odlišné výsledky oproti nám. Dle Moulédouse a spol. chronické ovlivnění nediferencovaných SH-SY5Y buněk opioidním agonistou fentanylem nemělo vliv na množství p-ERK1/2 (Moulédous et al., 2004). Toto zjištění je v souladu s prezentovanými výsledky naší práce. Ale Bilecki a spol. došli naopak k závěru, že chronické působení morfinu snížilo expresi p-ERK1/2 u nediferencovaných SH-SY5Y buněk, na druhou stranu množství nefosforylované formy ERK1/2 se nezměnilo, což odpovídá i našim výsledkům (Bilecki et al., 2005).

Působení samotného morfinu na buňky nemělo vliv na míru exprese transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B ani jeho fosforylované formy. Zablokování MOR a TLR4 naloxonem či samotné zablokování TLR4 TAK-242 také nezměnilo expresi obou forem transkripčního faktoru. Současné podání obou jednotlivých antagonistů s morfinem neovlivnilo taktéž množství tohoto transkripčního faktoru. Poměr exprese pNF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B se také nezměnil vůči kontrole. Tento výsledek lze předpokládat vzhledem k tomu, že morfin vykazuje pouze 10% aktivaci TLR4 oproti aktivaci LPS (Stevens et al., 2013).

Nutno brát v potaz, že TLR4 jsou exprimovány zejména imunitními buňkami, tudíž i dostupná literatura popisuje změny v expresi tohoto transkripčního faktoru především u imunitních buněk, což je zcela jiný buněčný model, který nelze srovnávat s námi vybraným modelem diferencovaných SH-SY5Y buněk. Nicméně například jedna ze studií prováděných na mastocytech ukázala, že nízké koncentrace morfinu v řádu nanomolární zvyšovaly aktivaci NF- $\kappa$ B a naopak vyšší koncentrace morfinu v řádu mikromolární snižovaly jeho aktivaci (Roy et al., 1998).

Ovlivnění diferencovaných buněk všemi dříve uvedenými látkami a jejich kombinacemi nevedlo k signifikantnímu rozdílu v expresi CREB, nicméně exprese p-CREB se signifikantně zvýšila po působení morfinu a naloxonu na buňky. Ostatní látky ani jejich kombinace neměly vliv na expresi p-CREB. Poměr exprese p-CREB/CREB se také signifikantně zvýšil u buněk ovlivněných morfinem a naloxonem. K odlišným výsledkům došly studie, které použily model primární kultury buněk ze spinálních ganglií dorzálních kořenů a izolované potkaní kortikální neurony. Tyto práce prokázaly zvýšenou expresi p-CREB po chronickém ovlivnění buněk morfinem (Cao et al., 2013; Ma et al., 2001).

V naší práci se nepodařilo prokázat, že chronické působení morfinu ovlivňuje zkoumané receptory a většinu zvolených členů MAPK signální kaskády. Pro hlubší porozumění vlivu chronického morfinu bude nutné provést analýzy dalších proteinů MAPK signální kaskády. Nové výsledky by mohlo přinést i testování členů klasických signálních drah obou receptorů. Výhodou by bylo také zařadit více experimentálních přístupů a sledovat změny v signálních drahách nejen po působení morfinu, ale i po následném vyvolání oxidativního stresu.

## 7 Závěr

V naší práci jsme se zaměřili na vliv morfinu na přežití buněk po působení oxidativního stresu. Pro účely této práce byl zvolen model neuroblastomové linie SH-SY5Y buněk, které v diferencovaném stavu odpovídají neuronům. Úspěšnost diferenciaci buněk do maturovaných nervových buněk byla potvrzena vysokým nárůstem exprese markerů diferenciaci. Hlavním cílem naší práce bylo objasnit vliv chronického působení morfinu na viabilitu diferencovaných SH-SY5Y buněk po působení oxidativního stresu, který byl navozen analogem  $H_2O_2$  – tBHP. Výsledky ukazují, že dlouhodobé působení morfinu na buňky má protektivní účinky proti vyvolanému oxidativnímu stresu. Nejvyšší nárůst ve viabilitě buněk byl pozorován při použití 10  $\mu M$  koncentrace morfinu.

Poslední výzkumy ukazují, že morfin může působit na buňky nejen přes MOR, ale i přes TLR4, proto naším dalším cílem bylo posoudit roli aktivace MOR a TLR4 v protektivním působení morfinu. Ke splnění vytyčeného cíle byly použity antagonisté obou receptorů a metoda RNA interference. Výsledky naší práce naznačují, že protektivní účinek morfinu lze přisoudit spíše TLR4 než samotným MOR, nicméně k hlubšímu pochopení role TLR4 v protektivních účincích morfinu by bylo s výhodou provést další experimenty a zablokovat i TLR4 metodou RNA interference.

Dále tato práce zkoumala vliv morfinu a specifických receptorových antagonistů na expresi MOR, TLR4 a členů MAPK signální kaskády, která je společná oběma zmíněným receptorům. Podobně, byly sledovány i změny v expresi transkripčních faktorů – NF- $\kappa B$  a CREB, které jsou spjaty se signalizací TLR4, resp. MOR. Nepodařilo se odhalit žádné signifikantní změny v expresi obou receptorů ani vybraných členů MAPK. Pouze v případě fosforylované formy transkripčního faktoru CREB byla zjištěna signifikantní změna exprese u vzorků buněk ovlivněných morfinem a naloxonem. V souvislosti s tématem oxidativního stresu by bylo zajímavé provést také experimenty přímého vlivu tBHP na signální kaskádu MAPK.

Porozumění mechanismů oxidativního stresu by mohlo odpovědět na některé otázky spojené s neurodegenerativními onemocněními jako je kupř. Parkinsonova choroba. Role oxidativní stresu je také často zmiňována v souvislosti s aterosklerózou aj. Sledování vlivu morfinu na lidský organismus má smysl i pro pacienty, kterým je morfin dlouhodobě podáván, typickou skupinou jsou např. onkologičtí pacienti. V oblasti této problematiky bude nutné provést ještě řadu studií.

## 8 Seznam použité literatury

- Agholme, L., Lindström, T., Kågedal, K., Marcusson, J., Hallbeck, M., 2010. An In Vitro Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons. *J. Alzheimers Dis.*, 20, 1069–1082.
- Akerman, K. E. O., Scott, I. G., Anderson, L. C., 1984. Functional differentiation of a human ganglion cell-derived neuroblastoma cell line SH-SY5Y induced by a phorbol ester (TPA). *Neurochem. Int.*, 6, 77-80.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373–399.
- Bechleva, M.M., Clark, A.L., Haas, P.D., Hahn, J.W., Kiss, A., Coscia, C.J., 2005.  $\mu$  and  $\kappa$  Opioid Receptors Activate ERK/MAPK via Different Protein Kinase C Isoforms and Secondary Messengers in Astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 30, 27662–27669.
- Berhow, M.T., Hiroi, N., Nestler, E.J., 1996. Regulation of ERK (extracellular signal regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine. *J. Neurosci.*, 15, 4707-4715.
- Bhat, R.S., Bhaskaran, M., Mongia, A., Hitosugi, N., Singhal, P.C., 2004. Morphine-induced macrophage apoptosis: oxidative stress and strategies for modulation. *J. Leukoc. Biol.*, 75, 1131–1138.
- Biedler, J.L., Helson, L., Spengler, B.A., 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.*, 33, 2643–2652.
- Bilecki, W., Zapart, G., Ligęza, A., Wawrzczak-Bargiela, A., Urbański, M.J., Przewłocki, R., 2005. Regulation of the extracellular signal-regulated kinases following acute and chronic opioid treatment. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62, 2369–2375.
- Borner, C., Holtt, V., Kraus, J., 2012. Mechanisms of the Inhibition of Nuclear Factor- B by Morphine in Neuronal Cells. *Mol. Pharmacol.*, 81, 587–597.
- Botos, I., Segal, D.M., Davies, D.R., 2011. The Structural Biology of Toll-like Receptors. *Structure*, 19, 447–459.
- Cao, L.H., Li, H.T., Lin, W.Q., Tan, H.Y., Xie, L., Zhong, Z.J., Zhou, J.H., 2016. Morphine, a potential antagonist of cisplatin cytotoxicity, inhibits cisplatin-induced apoptosis and suppression of tumor growth in nasopharyngeal carcinoma xenografts. *Sci. Rep.*, 6, 1-10.
- Cao, M., Liu, F., Ji, F., Liang, J., Liu, L., Wu, Q., Wang, T., 2013. Effect of c-Jun N-terminal kinase (JNK)/p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in morphine-induced tau protein hyperphosphorylation. *Behav. Brain Res.*, 237, 249-255.
- Caputi, F.F., Lattanzio, F., Carretta, D., Mercatelli, D., Cendeletti, S., Romualdi, P., 2013. Morphine and Fentanyl Differently Affect MOP and NOP Gene Expression in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *J. Mol. Neurosci.*, 51, 532-538.



- Cohen, N., Betts, D.R., Rechavi, G., Amariglio, N., Trakhtenbrot, L., 2003. Clonal expansion and not cell interconversion is the basis for the neuroblast and nonneuronal types of the SK-N-SH neuroblastoma cell line. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 143, 80–84.
- Cong, X., Campomanes, P., Kless, A., Schapitz, I., Wagener, M., Koch, T., Carloni, P., 2015. Structural Determinants for the Binding of Morphinan Agonists to the  $\mu$ -Opioid Receptor. *PLoS One*, 8, 1-15.
- Costa-Malaquias, A., Almeida, M.B., Souza Monteiro, J.R., Macchi, Nascimento, J.L.M., Crespo-Lopez, M.E., 2014. Morphine Protects against Methylmercury Intoxication: A Role for Opioid Receptors in Oxidative Stress? *PLoS One*, 9, 1-7.
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., Gallego, C., Comella, J.X., 2000. Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid. *J. Neurochem.*, 75, 991-1003.
- Franchi, S., Moretti, S., Castelli, M., Lattuada, D., Scavullo, C., Panerai, A.E., Sacerdote, P., 2012.  $\mu$  opioid receptor activation modulates Toll like receptor 4 in murine macrophages. *Brain. Behav. Immun.*, 26, 480–488.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, 88, 435-437.
- Gach, K., Szemraj, J., Stasikowska-Kanicka, O., Danilewicz, M., Janecka, A., 2011. Opioid-receptor gene expression and localization in cancer cells. *Cent. Eur. J. Biol.*, 6, 10-15.
- Goudas, L.C., Langlade, A., Serrie, A., Matson, W., Milbury, P., Thurel, C., Sandouk, P., Carr, D.B., 1997. Acute decreases in cerebrospinal fluid glutathione levels after intracerebroventricular morphine for cancer pain. *Anesth. Analg.*, 89, 1209-1215.
- Grace, P.M., Ramos, K.M., Rodgers, K.M., Wang, X., Hutchinson, M.R., Lewis, M.T., Morgan, K.N., Kroll, J.L., Taylor, F.R., Strand, K.A., Zhang, Y., Berkelhammer, D., Huey, M.G., Greene, L.I., Cochran, T.A., Yin, H., Barth, D.S., Johnson, K.W., Rice, K.C., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2014. Activation of adult rat CNS endothelial cells by opioid-induced toll-like receptor 4 (TLR4) signaling induces proinflammatory, biochemical, morphological, and behavioral sequelae. *Neuroscience*, 280, 299–317.
- Grundmann, M., Merten, N., Malfacini, D., Inoue, A., Preis, P., Simon, K., Zielger, N., 2018. Lack of beta-arrestin signaling in the absence of active G proteins. *Nat. Commun.*, 9, 1-16.
- Guzmán, D.C., Brizuela, N.O., Alvarez, R.G., García, E.H., Mejía, G.B., Olguín, H.J., 2009. Cerebrolysin and morphine decrease glutathione and 5-hydroxyindole acetic acid levels in fasted rat brain. *Biomed. Pharmacother.*, 63, 517-521.
- Guzmán, D.C., Vázquez, I.E., Brizuela, N.O., Alvarez, R.G., Mejía, G.B., García, E.H., Santamaría, D., de Apreza, M. la R., Olguín, H.J., 2006. Assessment of Oxidative Damage Induced by Acute Doses of Morphine Sulfate in Postnatal and Adult Rat Brain. *Neurochem. Res.*, 31, 549–554.
- Haghjooy-Javanmard, S., Ghasemi, A., Laher, I., Zarrin, B., Dana, N., Vaseghi, G., 2018. Influence of morphine on TLR4/ NF- $\kappa$ B signaling pathway of MCF-7 cells. *Bratislava Medical Journal*, 119, 229-233.
- Hu, S., Sheng, W.S., Lokensgard, J.R., Peterson, P.K., 2002. Morphine induces apoptosis of human microglia and neurons. *Neuropharmacol.*, 42, 829-836.

Hutchinson, M.R., Loram, L.C., Zhang, Y., Shridhar, M., Rezvani, N., Berkelhammer, D., Phipps, S., Foster, P.S., Landgraf, K., Falke, J.J., Rice, K.C., Maier, S.F., Yin, H., Watkins, L.R., 2010. Evidence that tricyclic small molecules may possess toll-like receptor and myeloid differentiation protein 2 activity. *Neuroscience*, 168, 551–563.

Hutchinson, M.R., Zhang, Y., Brown, K., Coats, B.D., Shridhar, M., Sholar, P.W., Patel, S.J., Crysdale, N.Y., Harrison, J.A., 2008. Non-stereoselective reversal of neuropathic pain by naloxone and naltrexone: involvement of toll-like receptor 4 (TLR4). *Eur. J. Neurosci.*, 28, 20-29.

Hutchinson, M.R., Zhang, Y., Shridhar, M., Evans, J.H., Buchanan, M.M., Zhao, T.X., Slivka, P.F., Coats, B.D., Rezvani, N., Wieseler, J., Hughes, T.S., Landgraf, K.E., Chan, S., Fong, S., Phipps, S., Falke, J.J., Leinwand, L.A., Maier, S.F., Yin, H., Rice, K.C., Watkins, L.R., 2010. Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. *Brain. Behav. Immun.*, 24, 83–95.

Chartoff, E.H., Connery, H.S., 2014. It's MORE exciting than mu: crosstalk between mu opioid receptors and glutamatergic transmission in the mesolimbic dopamine system. *Front. Pharmacol.*, 5., 1-21.

Chen, Y., Mestek, A., Hurley, J.A., Yu, L., 1993. Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol*, 44, 8-12.

Cheung, Y.-T., Lau, W.K.-W., Yu, M.-S., Lai, C.S.-W., Yeung, S.-C., So, K.-F., Chang, R.C.-C., 2009. Effects of all-*trans*-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *NeuroToxicology*, 30, 127–135.

Childers, 1991. Opioid receptor-coupled second messenger systems. *Life Sciences*, 58, 1991-2003.

Choi Y.J., Kwak, E.B., Lee, J.W., Lee, Y.S., Cheong, I.Y., Lee, H.J., Kim, S.S., Kim, M.J., Kwon, Y.S., Chun, W., 2011. Cytoprotective Effects of Docosyl Caffeate against tBHP Induced Oxidative Stress in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *Biomol. Ther.*, 19, 195-200.

Jenab, S., Inturrisi, C.E., 2013. Retinoic acid regulation of mu opioid receptor and c-fos mRNAs and AP-1 DNA binding in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 99, 34-39.

Jin, M.S., Lee, J.-O., 2008. Structures of the Toll-like Receptor Family and Its Ligand Complexes. *Immunity*, 29, 182–191.

Kim, H.M., Park, B.S., Kim, S.E., Lee, J., Oh, S.C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O.J., 2007. Crystal Structure of the TLR4-MD-2 Complex with Bound Endotoxin Antagonist Eritoran. *Cell*, 130, 906-917.

Kim, M.S., Cheong, Y.P., So, H.S., Lee, K.M., Kim, T.Y., Oh, J., Chung, Y.T., Son, Y., Kim, B.R., 2001. Protective effects of morphine in peroxynitrite-induced apoptosis of primary rat neonatal astrocytes-potential involvement of G protein and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase). *Biochem. Pharmacol.*, 61, 779-786.

Kovalevich, J., Langford, D., 2013. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods Mol. Biol.*, 1078, 9-21.

Krishnamurthy, P.K., Mays, J.L., Bijur, G.N., Johnson, G.V., 2000. Transient oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells results in caspase dependent and independent cell death and tau proteolysis. *J. Neurosci. Res.*, 61, 512-523.

- Kunzler, A., Zeidán-Chuliá, F., Gasparotto, J., Girardi, C.S., Klafke, K., Petiz, L.L., Bortolin, R.C., Rostirolla, D.C., Zanotto-Filho, A., de Bittencourt Pasquali, M.A., Dickson, P., Dunkley, P., Moreira, J.C.F., Gelain, D.P., 2017. Changes in Cell Cycle and Up-Regulation of Neuronal Markers During SH-SY5Y Neurodifferentiation by Retinoic Acid are Mediated by Reactive Species Production and Oxidative Stress. *Mol. Neurobiol.*, 54, 6903–6916.
- Lawrimore, C.J., Crews, F.T., 2017. Ethanol, TLR3, and TLR4 Agonists Have Unique Innate Immune Responses in Neuron-Like SH-SY5Y and Microglia-Like BV2. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 41, 939–954.
- Lee, J., Kim, M., Park, C., Jung, E., Choi, D., Kim, T., Moon, S., Park, R., 2004. Morphine Prevents Glutamate-Induced Death of Primary Rat Neonatal Astrocytes Through Modulation of Intracellular Redox. *Immunotoxicol.*, 26, 17–28.
- Lin, X., Li, Q., Wang, Y.-J., Ju, Y.-W., Chi, Z.-Q., Wang, M.-W., Liu, J.-G., 2007. Morphine inhibits doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and nuclear factor  $\kappa$ B transcriptional activation in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem. J.*, 406, 215–221.
- Lin, X., Wang, Q., Ji, J., Yu, L.-C., 2010. Role of MEK-ERK pathway in morphine-induced conditioned place preference in ventral tegmental area of rats. *J. Neurosci. Res.*, 88, 1595–1604.
- Lin, X., Wang, Y.-J., Li, Q., Hou, Y.-Y., Hong, M.-H., Cao, Y.-L., Chi, Z.-Q., Liu, J.-G., 2009. Chronic high-dose morphine treatment promotes SH-SY5Y cell apoptosis via c-Jun N-terminal kinase-mediated activation of mitochondria-dependent pathway: Role of JNK signaling in morphine-induced apoptosis. *FEBS J.*, 276, 2022–2036.
- Lopes, F.M., da Motta, L.L., De Bastiani, M.A., Pfaffenseller, B., Aguiar, B.W., de Souza, L.F., Zanatta, G., Vargas, D.M., Schönhofen, P., Londero, G.F., de Medeiros, L.M., Freire, V.N., Dafre, A.L., Castro, M.A.A., Parsons, R.B., Klamt, F., 2017. RA Differentiation Enhances Dopaminergic Features, Changes Redox Parameters, and Increases Dopamine Transporter Dependency in 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. *Neurotox. Res.*, 31, 545–559.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., Ohashi, P.S., 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42, 145–151.
- Luchtman, D.W., Song, C., 2010. Why SH-SY5Y cells should be differentiated. *Neurotoxicology*, 31, 164–165.
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.*, 224, 164–175.
- Luttrell, L.M., Miller, W.E., 2013. Arrestins as regulators of kinases and phosphatases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 118, 115–147.
- Ma, W., Zheng, W.H., Powell, K., Jhamanda, K., Quirion, R., 2001. Chronic morphine exposure increases the phosphorylation of MAP kinases and the transcription factor CREB in dorsal root ganglion neurons: an in vitro and in vivo study. *Eur. J. Neurosci.*, 14, 1091–1104.
- Madera-Salcedo, I.K., Cruz, S.L., Gonzalez-Espinosa, C., 2013. Morphine Prevents Lipopolysaccharide-Induced TNF Secretion in Mast Cells Blocking I B Kinase Activation and SNAP-23 Phosphorylation: Correlation with the Formation of a Beta-Arrestin/TRAF6 Complex. *J. Immunol.*, 191, 3400–3409.

- Matsunaga, N., Tsuchimori, N., Matsumoto, T., Ii, M., 2011. TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Mol. Pharmacol.*, 79, 34-41.
- Miloso, M., Villa, D., Crimi, M., Galbiati, S., Donzelli, E., Nicolini, G., Tredici, G., 2004. Retinoic acid-induced neuritogenesis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is ERK independent and PKC dependent. *J. Neurosci. Res.*, 75, 241-252.
- Moresco E.M., LaVine, D., Beutler, B., 2011. Toll-like receptors. *Curr. Biol.*, 21, 488-493.
- Mouledous, L., Diaz, M.F., Gutstein, H.B., 2004. Modulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity by acute and chronic opioid treatment in neuronal and glial cell lines. *J. Neurochem.*, 90, 1371-1377.
- Niedernhofer, L.J., Daniels, J.S., Rouzer, C.A., Greene, R.E., Marnett, L.J., 2003. Malondialdehyde, a Product of Lipid Peroxidation, Is Mutagenic in Human Cells. *J. Biol. Chem.*, 278, 31426-31433.
- Ortiz, J., Harris, H.W., Guitart, X., Terwilliger, R.Z., Haycock, J.W., Nestler, E.J., 1995. Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain- regional distribution and regulation by chronic morphine. *J. Neurosci.*, 15, 1285-1297.
- Park, B.S., Lee, J.-O., 2013. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp. Mol. Med.*, 45, 1-9.
- Payabvash, S., Beheshtian, A., Salmasi, A.H., Kiumehr, S., Ghahremani, M.H., Tavangar, S.M., Sabzevari, O., Dehpour, A.R., 2006. Chronic morphine treatment induces oxidant and apoptotic damage in the mice liver. *Life Sci.*, 79, 972-980.
- Pogozheva, I.D., Lomize, A.L., Mosberg, H.I., 1995. Opioid Receptor Three-Dimensional Structures from Distance Geometry Calculations with Hydrogen Bonding Constraints. *Biophys. J.*, 75, 612-634.
- Prenus, R.V., Luscar, E., Zhu, Z.P., Badisa, R.B., Goodman, C.B., 2012. Regulation of mammalian MOR-1 gene expression after chronic treatment with morphine. *Int. J. Mol. Med.*, 30, 1493-1497.
- Presgraves, S.P., Ahmed, T., Borwege, S., Joyce, J.N., 2004. Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox. Res.*, 5, 579-598.
- Qian, L., Tan, K.S., Wei, S.-J., Wu, H.-M., Xu, Z., Wilson, B., Lu, R.-B., Hong, J.-S., Flood, P.M., 2007. Microglia-Mediated Neurotoxicity Is Inhibited by Morphine through an Opioid Receptor-Independent Reduction of NADPH Oxidase Activity. *J. Immunol.*, 179, 1198-1209.
- Qiao, J., Paul, P., Lee, S., Qiao, L., Josifi, E., Tiao, J.R., Chung, D.H., 2012. PI3K/AKT and ERK regulate retinoic acid-induced neuroblastoma cellular differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 424, 421-426.
- Rostami, F., Oryan, S., Ahmadiani, A., Dargahi, L., 2012. Morphine Preconditioning Protects Against LPS-Induced Neuroinflammation and Memory Deficit. *J. Mol. Neurosci.*, 48, 22-34.
- Roux, P.P., Blenis, J., 2004. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68, 320-344.

- Roy, S., Cain, K.J., Chapin, R.B., Charboneau, R.G., Barke, R.A., 1998. Morphine modulates NF- $\kappa$ B activation in macrophages. *Biophys. Res. Commun.*, 245, 392-396.
- Saify, K., Saadat, M., 2016. Expression levels of OPRM1 and PDYN in human SH-SY5Y cells treated with morphine and methadone. *Life. Sci.*, 150, 39-41.
- Samarghandia, S., Afshari, R., Farkhondeh, T., 2014. Effect of long-term treatment of morphine on enzymes, oxidative stress indices and antioxidant status in male rat live. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 7, 1449-1453.
- Shipley, M.M., Mangold, C.A., Szpara, M.L., 2016. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *J. Vis. Exp.*, 108, 1-11.
- Schneider, L., Giordano, S., Zelickson, B.R., Johnson, M., Benavides, G., Ouyang, X., Fineberg, N., Zhang, J., 2013. Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 51, 2007-2017.
- Singhal, P.C., Pamarthi, M., Shah, R., Chandra, D., Gibbons, N., 1994. Morphine stimulates superoxide formation by glomerular mesangial cells. *Inflammation.*, 18, 293-299.
- Stevens, C., Aravind, S., Das, S., Davis, R., 2013a. Pharmacological characterization of LPS and opioid interactions at the toll-like receptor 4: Opioids and toll-like 4 receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 168, 1421-1429.
- Škrabalová, J., Drastichová, Z., Novotný, J., 2013. Morphine as a Potential Oxidative Stress-Causing Agent. *Mini. Rev. Org. Chem.*, 10, 367-372.
- Teppola, H., Sarkanen, J.-R., Jalonen, T.O., Linne, M.-L., 2016. Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol. *Neurochem. Res.*, 41, 731-747.
- Trapaidze, N., Gomes, I., Cvejic, S., Bansinath, M., Devi, L.A., 2000. Opioid receptor endocytosis and activation of MAP kinase pathway. *Brain. Res. Mol. Brain Res.*, 76, 220-228.
- Waldhoer, M., Bartlett, S.E., Whistler, J.L., 2004. Opioid Receptors. *Annu. Rev. Biochem.*, 73, 953-990.
- Wang, D., Raehal, K.M., Bilsky, E.J., Sadée, W., 2001. Inverse agonists and neutral antagonists at mu opioid receptor (MOR): possible role of basal receptor signaling in narcotic dependence. *J. Neurochem.*, 77, 1590-1600.
- Wang, X., Loram, L.C., Ramos, K., de Jesus, A.J., Thomas, J., Cheng, K., Reddy, A., Somogyi, A.A., Hutchinson, M.R., Watkins, L.R., Yin, H., 2012. Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109, 6325-6330.
- Wang, X., Zhang, Y., Peng, Y., Hutchinson, M.R., Rice, K.C., Yin, H., Watkins, L.R., 2016. Pharmacological characterization of the opioid inactive isomers (+)-naltrexone and (+)-naloxone as antagonists of toll-like receptor 4. *Br. J. Pharmacol.*, 173, 856-869.
- Watkins, L.R., Hutchinson, M.R., Rice, K.C., Maier, S.F., 2009 - The "Toll" of Opioid-Induced Glial Activation: Improving the Clinical Efficacy of Opioids by Targeting Glia. *Trends Pharmacol. Sci.*, 30, 581-591.

Yu, Y.M., Han, P.L., Lee, J.K., 2003. JNK pathway is required for retinoic acid-induced neurite outgrowth of human neuroblastoma. *Neuroreport*, 14, 941-945.

Zhang, Y.T., Zheng, Q.S., Pan, J., Zheng, R.L., 2004. Oxidative damage of biomolecules in mouse liver induced by morphine and protected by antioxidants. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 95, 53-58.

Zheng, H., Loh, H.H., Law, P.Y., 2008.  $\beta$ -Arrestin-Dependent  $\mu$ -Opioid Receptor-Activated Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERKs) Translocate to Nucleus in Contrast to G Protein-Dependent ERK Activation. *Mol. Pharmacol.*, 73, 178-190.

Zhou, J., Li, Y., Yan, G., Bu, Q., Lv, L., Yang, Y., Zhao, J., Shao, X., Deng, Y., Zhu, R., Zhao, Y., Cen, X., 2011. Protective Role of Taurine Against Morphine-Induced Neurotoxicity in C6 Cells via Inhibition of Oxidative Stress. *Neurotox. Res.*, 20, 334–342.